



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESTUDO SERO-EPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE CANINA NA SUB-REGIÃO DO PINHAL INTERIOR SUL

Humberto Santos Pires

Orientador: Professor Helder Cortes
Co-orientador: Dr. Fernando Monteiro

2011
ÉVORA



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESTUDO SERO-EPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE CANINA NA SUB-REGIÃO DO PINHAL INTERIOR SUL

Humberto Santos Pires

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Orientador: Professor Helder Cortes

Co-orientador: Dr. Fernando Monteiro

Este documento inclui as correcções sugeridas pelo Júri.

2011

ÉVORA

Colaboradores & agradecimentos

Dra. Antónia Reis

Téc.Labo. Maria João Vila Viçosa

Professor Helder Cortes

Laboratório de Parasitologia Vitor Caeiro

Universidade de Évora

Dra. Solange Pacheco

Professor Telmo Nunes

Departamento de Epidemiologia

Universidade Técnica de Lisboa

Professor Luís Lucas Cardoso

Departamento de Ciências Veterinárias

Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro

Professor Manuel Martins

Departamento de Histopatologia

Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Dr. Fernando Monteiro

Orientador de estágio, Veterinário Municipal de Mação

Resumo

Estudo sero - epidemiológico da leishmaniose canina na sub - região do Pinhal Interior Sul

No presente trabalho, os concelhos de Mação, Proença-a-Nova e Vila de Rei pertencentes à sub-região do Pinhal Interior Sul, constituíram as áreas geográficas alvo de estudo sero-epidemiológico. Procedeu-se ao preenchimento de questionário epidemiológico e à análise por ELISA, de amostras de soro de 282 animais, durante o período de campanha de vacinação anti-rábica. Observou-se que, os cães de Proença-a-Nova e de Vila do Rei tinham mais probabilidade de serem seropositivos do que os cães de Mação. A análise de agregados espaciais ("*clusters*") permitiu detectar regiões geográficas cujo risco de existir doença é consideravelmente maior do que nas restantes áreas em estudo. Através da análise geoespacial demonstrou-se a distribuição da seroprevalência de leishmaniose nos três concelhos, concluindo-se que existem duas áreas com maior probabilidade de um cão estar seropositivo. Demonstrou-se também, possível relação entre alguns tipos de ocupação do solo e o nível de seroprevalência.

Palavras-chave: Análise estatística; análise geoespacial; estudo sero - epidemiológico; leishmaniose canina; sub - região Pinhal Interior Sul;

Abstract

Study serum - epidemiological of canine leishmaniasis in the sub - region Pinhal Interior Sul

In this study the counties of Mação, Proença-a-Nova and Vila de Rei, within the sub-region of Pinhal Interior Sul, were the geographic areas investigated by a sero-epidemiological study. Both an epidemiological questionnaire and the screening of serum samples from animals by ELISA with sera from 282 dogs took place during the vaccination campaign against rabies. Dogs from Proença-a-Nova and Vila de Rei had an increased risk a seropositivity than the dogs of Mação. The spatial *cluster* analysis identified geographic areas where there is a considerably higher risk of seropositivity than in the other areas of the study. Geospatial analysis showed the distribution of geospatial prevalence of leishmaniosis in the three counties, which may allow the conclusion that there are two areas with higher relative risk of seropositivty in dogs. A potential association between some types of land occupation and seroprevalence level has also been demonstrated.

Keywords: Statistical analysis; geospatial analysis; study sero - epidemiological; canine leishmaniosis; sub - region Pinhal Interior Sul;

Índice geral

Colaboradores & agradecimentos	I
Resumo.....	II
Abstract.....	III
Índice geral	IV
Índice de figuras	VII
Índice de tabelas	IX
Índice de anexos	X
Lista de abreviaturas.....	X

I. Revisão bibliográfica sobre leishmaniose canina

1. Introdução.....	1
1.1. Breve nota Histórica	2
2. Biologia do parasita	4
2.1. Etiologia.....	4
2.2. Morfologia.....	6
2.3. Replicação e genoma	8
3. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	8
3.1. Desenvolvimento de <i>Leishmania</i> no vector	9
3.2. Desenvolvimento de <i>Leishmania</i> no hospedeiro mamífero	10
3.2.1 Inoculação de Promastigotas metacíclicos	10
3.2.2. Internalização do parasita.....	10
3.2.3. Diferenciação das formas promastigotas	11
3.2.4. Desenvolvimento de amastigotas nos macrófagos	12
3.3. Transmissão não vectorial	13
4. O vector	14
5. Epidemiologia da leishmaniose canina	17
5.1. Epidemiologia da LCan em Portugal.....	19
5.2.Epidemiologia na população silvestre	21
6. Patogenia	21
7. Sinais clínicos e lesões da leishmaniose canina	24
7.1.Sistema tegumentar.....	25
7.2. Sistema hematopoiético.....	27

7.3. Sistema renal.....	28
7.4. Sistema digestivo e órgãos anexos	29
7.5. Sistema ocular	29
7.6. Sistema cardiorrespiratório	30
7.8. Sistema músculoesquelético	30
8. Diagnóstico	32
8.1. Alterações hematológicas e bioquímicas	32
8.2. Diagnóstico laboratorial	33
8.2.1. Método directo	34
8.2.1.1. Exame microscópico.....	34
8.2.1.2. Exame histopatológico.....	34
8.2.1.3. Imunohistoquímica.....	35
8.2.1.4. Cultura	35
8.2.1.5. Isolamento do parasita em animais de laboratório	36
8.2.1.6. Xenodiagnóstico	36
8.2.1.7. Reacção em cadeia da polimerase	36
8.2.2. Método indirecto	38
8.2.2.1. Ensaio imuno-enzimático	38
8.2.2.2. Imunofluorescência indirecta	40
8.2.2.3. Ensaio de imunodifusão.....	40
8.2.2.4. Teste de aglutinação directa	40
8.2.2.5. “Kits” rápidos.....	41
8.2.2.6. Métodos imunológicos com aplicações experimentais.	41
8.2.3. Imunidade celular	41
8.2.3.1. Reacção de Montenegro.....	41
8.2.3.2. Teste intradérmico	41
9. Tratamento	42
9.1. Compostos antimoniais.....	43
9.2. Análogos das purinas	44
9.4. Anfotericina B	45
9.5. Aminosidina	45
9.6. Pentamidina.....	46
9.7. Derivados do Imidazol	46
9.8. Fármacos Imunomoduladores	46
9.9. Tratamento sintomático	47
9.10. Fitoterapia e homeopatia	47

10. Vacinas.....	48
10.1. Vacinas de 1ª geração.....	49
10.1.1. Vacinas vivas.....	49
10.1.2. Vacinas vivas atenuadas	49
10.1.3. Vacinas inactivadas	49
10.2. Vacinas 2ª geração.....	50
10.2.1. Vacinas de fracções purificadas	50
10.2.2. Vacinas de antígenos recombinantes.....	51
10.3. Vacinas de 3ª geração.....	51
10.4. Vacinas baseadas em Proteínas salivares de flebótomos	52
11. Controlo da leishmaniose visceral zoonótica.....	52

II. Estudo sero-epidemiológico da leishmaniose canina na sub-região do Pinhal Interior Sul

1. Objectivos	54
2. Material e métodos.....	54
2.1. Área geográfica do estudo	54
2.2. Estudo por amostragem.....	55
2.3. Recolha das amostras de sangue.....	56
2.4. Caracterização da amostra	56
2.5. Técnica laboratorial.....	57
2.5.1. Processamento prévio da amostra	57
2.5.1.1. Material	57
2.5.1.2. Método de processamento.....	58
2.5.2. Técnica de ELISA.....	59
2.5.2.1. Protocolo de ELISA para <i>Leishmania infantum</i>	60
2.5.2.1.1. Material.....	60
2.5.2.1.2. Soluções e reagentes	60
2.5.2.1.3. Soluções finais a aplicar na placa de diagnóstico	61
2.5.2.1.4. Método.....	61
2.5.2.2. Interpretação.....	63
2.6. Análise estatística.....	63
3. Resultados	64
3.1. Análise estatística descritiva e análise não paramétrica dos dados da amostra	64
3.1.1. Seroprevalência e origem	64

3.1.2. Sexo	65
3.1.3. Comprimento do pêlo.....	66
3.1.4. Aptidão	66
3.1.5. Habitat	67
3.1.6. Idade	68
3.1.7. Sinais clínicos	70
3.2. Análise de dados por regressão logística múltipla.....	71
4. Discussão.....	72
5. Análise geoespacial de dados.....	75
5.1. Georeferenciação	75
5.2. Análise de agregados espaciais.....	76
5.3. Análise de factores de risco	76
5.3.1. Mapas com <i>buffers</i>	77
5.3.2. Caracterização da ocupação de solo	77
6. Resultados.....	78
6.1. Georeferenciação & Localização	78
6.2. Mapa de seroprevalências	79
6.3. Análise de agregados espaciais.....	80
6.4. Análise de factores de risco	82
6.4.1. <i>Buffers</i>	82
6.4.2. Caracterização da ocupação de solo.....	82
7. Discussão.....	84
8. Conclusão	87
9. Bibliografia	88

Índice de Figuras

Figura 1 - História evolutiva e geográfica de <i>Leishmania</i>	3
Figura 2 - Crânios de sepulturas antigas (10.000 anos), mostram extensas lesões causadas por <i>Leishmania</i> . Comprovado por métodos moleculares	4
Figura 3 - “Huaco mochica” com lesões sugestivas de leishmaniose cutânea.....	4
Figura 4 A - Representação esquemática dos diferentes organelos da forma amastigota e promastigota.....	7
Figura 4B - Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> , num esfregaço de medula óssea	7

Figura 4C - Formas promastigota de <i>Leishmania</i>	7
Figura 5 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	8
Figura 6 - Representação esquemática do desenvolvimento intravectorial de <i>Leishmania</i>	10
Figura 7 - Fêmea do género <i>phlebotomus</i>	14
Figura 8 - Densidade do vector em relação às variáveis meteorológicas	15
Figura 9 - Mapa da distribuição geográfica da leishmaniose e da co-infecção, leishmania/ VIH (1990-1998)	17
Figura 10 - Distribuição da prevalência de leishmaniose no sudoeste da Europa	18
Figura 11 - Representação esquemática das diferentes proporções de animais infectados vs método de diagnóstico, numa população canina de região endémica	19
Figura 12 - Mapa da prevalência de leishmaniose canina em Portugal.....	20
Figura 13 - Representação esquemática da interacção entre a proliferação de linfócitos do tipo Th1 e Th2, num cão com leishmaniose	23
Figura 14 - Dermatite exfoliativa não pruriginosa na região peri-ocular e crostas na região nasal.....	25
Figura 15 - Dermatite ulcerativa, acompanhada de hiperqueratose na região tíbio-társica	25
Figura 16 - Hiperqueratose e epistáxis ao nível do plano nasal	27
Figura 17 - Onicogribose	27
Figura 18 - Queratoconjuntivite seca e blefarite exfoliativa peri-ocular	30
Figura 19 - Radiografia dorso-ventral da pélvis sugere osteólise e reacção osteoproliferativa no grande trocânter do fémur esquerdo.....	31
Figura 20 - Caquexia e anorexia	31
Figura 21 - Fácies senil	31
Figura 22 - Lesões nodulares na face dorsal e lateral da língua	31
Figura 23 - Esquema a seguir no diagnóstico de LCan.....	33
Figura 24A - Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> intracelulares evidenciadas através da técnica de imunoperoxidase	35
Figura 24B - Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> extracelulares evidenciadas através da técnica de imunoperoxidase	35
Figura 24C - Reacção de imunofluorescência directa positiva das formas amastigotas do parasita	35
Figura 25 - Sub- região do Pinhal Interior Sul.....	55
Figura 26 - Recolha de amostra de sangue	56
Figura 27 - Processamento prévio das amostras no laboratório da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.....	57
Figura 28 - Recolha das fracções descritas para tubos de 2 ml.....	58
Figura 29 - Esfregaço por gota de sangue.....	58

Figura 30 - Preparação de soluções	61
Figura 31 - Identificação das placas de ELISA	61
Figura 32 – Carregamento da placa de diagnóstico	61
Figura 33 - Leitura da placa de diagnóstico	62
Figura 34 - Interpretação dos resultados obtidos	63
Figura 35 - Épocas de transmissão a que os animais foram expostos.....	68
Figura 36 - Relação entre as épocas de transmissão e as seroprevalências	69
Figura 37 - Relação entre os sinais clínicos e a seropositividade por detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	70
Figura 38 - Representação geoespacial da área em estudo.....	78
Figura 39 – Mapa de georeferenciação	79
Figura 40 - Seroprevalência de leishmaniose por freguesia.....	80
Figura 41 – Mapa de representação geoespacial de <i>clusters</i>	81
Figura 42 - <i>Buffers</i> georreferenciados	82
Figura 43 - CORINE	84

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação taxonómica do género <i>Leishmania</i>	4
Tabela 2 - Principais espécies do género <i>Leishmania</i>	5
Tabela 3 - Classificação taxonómica do insecto vector	14
Tabela 4 - Sinais clínicos em cães com Lcan	25
Tabela 5 - Lesões cutâneas em cães com leishmaniose	26
Tabela 6 - Sensibilidades e especificidades correspondentes ao uso de diferentes proteínas recombinantes na técnica de ELISA para o diagnóstico de LCan	40
Tabela 7 - Homeoterapia e Fitoterapia no tratamento da leishmaniose canina	47
Tabela 8 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> nos concelhos de Mação, Proença-a-Nova e Vila de Rei	65
Tabela 9 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> em meio rural e semi-urbano	65
Tabela 10 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> segundo o género ..	66
Tabela 11 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> segundo o comprimento do pêlo	66
Tabela 12 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> segundo a aptidão ..	67
Tabela 13 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> segundo o habitat ..	67

Tabela 14 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> segundo o grupo etário	69
Tabela 15 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> segundo os sinais clínicos	70
Tabela 16 - Identificação de factores de risco para a seroprevalência de leishmaniose canina nos três concelhos.....	71
Tabela 17 - Caracterização dos <i>clusters</i>	81
Tabela 18 - Análise de factores de risco por tipos de ocupação de solo I	83
Tabela 19 - Análise de factores de risco por tipos de ocupação de solo II	84

Índice de anexos

Anexo 1- Caso clínico: leishmaniose visceral humana	i
Anexo 2 – Inquérito	ii
Anexo 3 - Soluções finais a aplicar na placa de diagnóstico	iii
Anexo 4 - Diluição do antigénio com a finalidade de preparar a solução de carregamento para aplicação na placa de ELISA	v
Anexo 5 - Caracterização das freguesias de acordo com a densidade populacional.....	vii
Anexo 6 - Nomenclatura CORINE Land Cover.....	viii
Anexo 7 - Caracterização da amostra respeitante ao rastreio de leishmaniose em 282 canídeos	ix

Lista de Abreviaturas

°C - Graus Celsius

% - Percentagem

= - Igual

≥ - Maior ou igual

≤ - Menor ou igual

μL - Microlitro

μg – Micrograma

μm - Micrometro

Ac - Anticorpo

Ag - Antigénio

ALT - Alanina amino-transferase

AST - Aspartato amino-transferase
 BID - A cada 12 horas
 BUN – Ureia; *Blood Urea Nitrogen*
 C3 - Proteína do complemento C3
 CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
 CLC - CORINE land cover
 CMH-II - Complexo maior de histocompatibilidade Classe II
 CR3 - Receptor de complemento
 DAT - Teste de aglutinação directa
 dl - Decilitro
 DNA - Ácido desoxirribonucleico
 ELISA - Ensaio imuno-enzimático; *Enzyme linked immunoabsorbent assay*
 FAS - Fosfatase alcalina sérica
 FML - Ligando fucose-manose
 FNT- α - Factor de necrose tumoral alfa
 FGT- β – Factor de crescimento transformante
 g - Grama
 GP63 - Glicoproteína 63
 HIV - Vírus da imunodeficiência humana
 IFI - Imunofluorescência indirecta
 IgG - Imunoglobulina G
 IgM - Imunoglobulina M
 IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical
 IL - Interleucina
 IM - Via intra-muscular
 INF- γ - Interferão gama
 IRC - Insuficiência renal crónica
 IV - Intravenosa
 kDNA - DNA do cinetoplasto
 kg - Quilograma
 km² - Quilómetros quadrados
 L - Litro
 LCan - Leishmaniose canina
 LPG - Lipofosfoglicano
 L.V.H - Leishmaniose visceral humana
 mg - Miligrama
 mRNA - RNA mensageiro

n.º - Número

O.M.S - organização mundial de saúde

ON - Óxido nítrico

O.R- “odds ratios”

P CR - Reacção em cadeia da polimerase; *Polymerase chain reaction*

PCR-RFLP – PCR - polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição; *PCR-restriction fragment length polymorphism*

PO - *Per os*

PT - Proteínas totais

pv - Peso vivo

RNA - Ácido ribonucleico

RT-PCR - PCR em tempo real; *Real Time-PCR*

SC - Via subcutânea

SID - A cada 24 horas

SMF - Sistema mononuclear fagocitário

Th1 - Linfócitos CD4+ T helper 1

Th2 - Linfócitos CD4+ T helper 2

WB - Western Blot

I. Revisão bibliográfica sobre leishmaniose canina

1. Introdução

Leishmaniose é a denominação genérica da doença causada por protozoários flagelados do género *Leishmania*. A Organização Mundial de Saúde considera a leishmaniose como uma das zoonoses mais importantes do mundo, tendencialmente endémica em regiões tropicais e subtropicais, estando presente em 88 países de quatro continentes (Ready, 2010). Os dados estatísticos referem ser a segunda doença parasitária com maior taxa de mortalidade, apenas excedida pela malária (Collin *et al.*, 2009).

Nos humanos, as formas clínicas de leishmaniose designam-se: leishmaniose mucocutânea, leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea. A incidência anual é de 0,5 milhões de casos referentes à leishmaniose visceral e 1,5 milhões de casos referentes à leishmaniose cutânea. Durante a última década tem-se verificado o aumento do número de pessoas infectadas, estimando-se que estejam em risco 350 milhões de pessoas (Fraga *et al.*, 2009).

Numa perspectiva global, os principais factores de risco na disseminação e ocorrência de novos casos prendem-se com as alterações ambientais, a utilização de terras florestais, o fluxo intenso de migrações humanas acompanhadas pelo desenvolvimento económico e tecnológico, o estado imunológico do hospedeiro influenciado por doenças concomitantes, a desnutrição, factores genéticos e por fim a resistência a drogas utilizadas no tratamento (Dujardin, 2006). Consideram-se os grupos de maior risco as crianças (criança = *infantum*), idosos e imunocomprometidos.

A leishmaniose canina (LCan) é uma doença infecciosa frequente na bacia mediterrânica, inclusive Portugal. Foi identificada pela primeira vez em canídeos em 1908, na Tunísia, por Nicolle e Compte. *L. infantum* é o principal agente causal da leishmaniose visceral ou kala-azar, nesta região. (Leandro *et al.*, 2001).

Nos canídeos, não se observa uma distinção tão evidente das manifestações clínicas como em humanos e os animais tendem a apresentar uma síndrome viscerocutânea. Apenas *L. infantum* (*L. chagasi* na América) parece ser relevante como agente de doença no cão. Não obstante, LCan fundamenta um crescente interesse que transcende o campo da saúde animal, constituindo-se um vero e grave problema de saúde pública (Tomás & Freitas Romão, 2008). Embora o cão seja considerado o principal reservatório para o homem (Baneth & Aroch, 2008), o protozoário também se encontra presente na população silvestre e selvagem (Dipineto *et al.*, 2007).

A infecção é transmitida entre hospedeiros vertebrados por insectos da subfamília *Phlebotominae* (Ready, 2010).

Os sinais clínicos comumente observados são as dermatites, a hipertrofia dos gânglios, a anorexia e a onicogribose. No entanto, a doença apresenta um cariz sistémico, com o

envolvimento de vários órgãos, aos quais se associam diferentes quadros sintomatológicos. Existe ainda uma alta percentagem de cães assintomáticos com ou sem diagnóstico realizado. Esta variabilidade sintomatológica apresenta-se como um dos principais contributos para a perpetuação da doença em diversas regiões (Moreno & Alvar, 2002).

O diagnóstico concludente de LCan é feito por observação directa das formas amastigotas ao microscópio, a partir de punção ou biopsia de órgãos infectados. Outros métodos de diagnóstico incluem a pesquisa de ADN de *Leishmania* através da técnica de PCR e a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* através de exames imunoenzimáticos (Baneth & Aroch, 2008).

Cada técnica utilizada para o diagnóstico apresenta vantagens e limitações e mesmo com todos os desenvolvimentos tecnológicos, o diagnóstico de LCan continua a ser um desafio. Todos os exames complementares devem ser seleccionados de acordo com os objectivos pretendidos (Porrozzi *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2009).

As acções para o controlo desta patologia não têm surtido efeito, havendo necessidade de um sistema de vigilância epidemiológica mais rigoroso, principalmente ao nível da região mediterrânica, com padronização tanto da definição de casos como das metodologias de diagnóstico utilizadas, objectivando, através do intercâmbio de informação e padronização do processamento de amostras, ultrapassar as dificuldades específicas relativas a esta patologia. Neste sentido, em Portugal, o Observatório Nacional de Leishmaniose (ONLEISH) criou a primeira rede epidemiológica da leishmaniose canina (LEISHNET), pioneira na Europa, de forma a criar sinergias que permitam prevenir e combater a doença. Esta rede vai permitir analisar o número de casos diagnosticados e tratados e ter uma noção real da evolução desta doença. “É urgente que cada país coloque rapidamente em prática sistemas de alerta que protejam as populações de doenças infecciosas” (Grupogoci, 2010).

1.1. Breve nota Histórica

As informações retiradas dos arquivos históricos, conjuntamente com as áreas de biologia molecular, paleontologia e arqueologia, cruzaram-se para definir um conceito “epidemiologia histórica”, com a finalidade de descodificar a origem de várias patologias em determinado tempo e lugar. Assim, surgem algumas teorias para traçar a génese e o perfil filogenético de alguns parasitas (Siviero & Furtado, 2005; Andrade *et al.*, 2006).

A origem paleártica de *Leishmania* do Novo Mundo teoriza que, no período Cretácio, existia uma espécie ancestral, *Sauroleishmania*, que tinha por hospedeiro os répteis, e que esteve na génese de *Leishmania*, quando passou, no início do Cenozóico, a dispor de uma variedade de mamíferos (Andrade *et al.*, 2006).

Acompanhando a fauna de roedores e outros hospedeiros, uma espécie ancestral de flebótomos migrou pela ponte do estreito de Behring, conduzindo à separação entre os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, após esta ser destruída, no Oligoceno (Andrade *et al.*, 2006).

Um estudo recente, baseado num conjunto de dados moleculares, que incluiu, análise de 18.000 caracteres para cada uma das 25 estirpes de *Leishmania*, representativas da distribuição a nível mundial, confirma que *Leishmania* teria origem no sul da América devido à diversidade genética e de aminoácidos combinados presente nas espécies neotropicais. Concluiu também que, durante o Miocénio (25-15 Milhões de anos) uma linhagem de *Leishmania* ter-se-ia dispersado através da Ásia central onde posteriormente se diferenciaria em várias linhagens.

Leishmania infantum diferenciada a partir de uma linhagem precoce de *Leishmania donovani* (1 Milhão de anos) invadiu a Índia e África, tendo estirpes europeias MON-1, há cerca de 500 anos atrás estabelecido contacto com estirpes da América do Sul (Fig. 1), considerando *Leishmania chagasi* sinónimo de *L. infantum* (Lukes *et al.*, 2007).

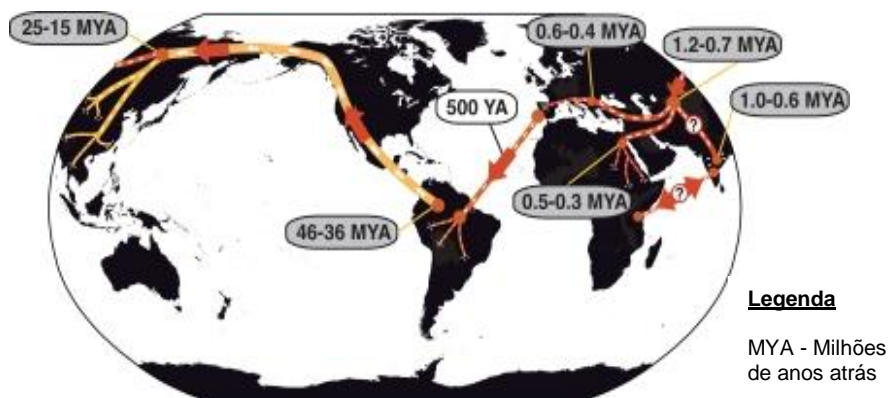


Fig. 1: História evolutiva e geográfica de *Leishmania* spp. (Lukes., *et al* 2007)

Com o início do sedentarismo, há 10.000 anos, a prática agrícola e a criação de animais favoreceram o aparecimento das primeiras vilas e por consequência a luta pela posse de terra, a devastação de florestas e o convívio com animais domésticos e silvestres (Costa *et al.*, 2009).

Verificando-se que, aquando da fundação das primeiras vilas na Bacia do Mediterrâneo e no mundo, surgiram os primeiros casos esporádicos de leishmaniose visceral ou kala-azar (Fig. 2) (Lukes *et al.*, 2007).

Representações em cerâmica do período pré-Inca no séc. I d.C. localizadas no Equador e Peru demonstram deformidades faciais compatíveis com a forma cutânea e mucocutânea de leishmaniose, o que prova que esta doença prevaleceu também nesta época, no Novo Mundo (Fig. 3) (Siviero & Furtado, 2005).



Fig. 2: Crânios de sepulturas antigas (10.000 anos), mostram extensas lesões causadas por *Leishmania* spp. Comprovado por métodos moleculares (Costa *et al.*, 2009)



Fig. 3: Huaco mochica com lesões sugestivas de leishmaniose cutânea (Siviero & Furtado, 2005)

No Velho Mundo, em Goa (1563) Garcia de Orta, médico português, publicou o *Colóquio dos simples e drogas e coisas medicinais da Índia*, onde descrevia um paciente com sinais claros de leishmaniose, curando-o com doses de raiz de gengibre-da-China em água de canela. Embora esta doença não tivesse sido registada, vários autores sugeriram que esta patologia deveria ter sido descrita como kala-azar de Orta (Gibson, 1983).

Em 1901, Leishman identificou determinados organismos num esfregaço de sangue proveniente do baço de um soldado morto pela febre de Dum-Dum. Inicialmente estes organismos foram considerados tripanossomas mas, em 1903, o Capitão Donovan descreveu-os como sendo uma espécie ainda não documentada. A ligação entre kala-azar e o organismo foi feita mais tarde pelo Major Ross. Estava definido um novo género: *Leishmania* (Balley & Bishop, 1959).

2. Biologia do parasita

2.1. Etiologia

O género *Leishmania*, Ross (1903) refere um conjunto de protozoários flagelados com a seguinte classificação taxonómica (Tab. 1):

Tabela 1: Classificação taxonómica do género *Leishmania* (Laura *et al.*, 2005)

Reino	Protista	Classe	Zoomastigophora
Sub-Reino	Protozoa	Ordem	Kinetoplastida
Filo	Sarcomastigophora	Família	Trypanosomatidae
Sub-filo	Mastigophora	Género	<i>Leishmania</i>

A taxonomia do género *Leishmania* é um assunto complexo e controverso, revisto e alterado com as descobertas e avanços científicos. Actualmente, de modo a sistematizar e simplificar a classificação, podemos dividir o género *Leishmania* em dois subgéneros, de acordo com a localização do seu desenvolvimento no vector (Tab. 2).

Leishmania quando o parasita ocorre na porção média e anterior do intestino do flebótomos e *Viannia* quando se desenvolve na porção posterior (Andrade *et al.*, 2006).

Tabela 2: Principais espécies do género *Leishmania* (adaptado de Andrade *et al.*, 2006)

Subgénero <i>Viannia</i>	Reservatório	Local	Subgénero <i>Leishmania</i>	Reservatório	Local
<i>L. (V.) braziliensis</i>	C; R; H	N	<i>L. (L.) donovani</i>	H	V
<i>L. (V.) peruviana</i>	H; R; C	N	<i>L. (L.) trópica</i>	H; C; R	V
<i>L. (V.) guyanensis</i>	P; R; H	N	<i>L. (L.) infantum</i>	C; H	V
<i>L. (V.) panamensis</i>	P; C; R; H	N	<i>L. (L.) major</i>	R; H	V
<i>L. (V.) lainsoni</i>	R; H	N	<i>L. (L.) archibaldi</i>	H	V
<i>L. (L.) chagasi</i>	C; H	N			

Legenda: Local de ocorrência (Local) no Velho Mundo (V) e Novo Mundo (N)

Reservatório: canídeo (C); roedores (R); Homem (H); preguiça (P); o reservatório principal é representado a negrito.

O género *Leishmania* compreende cerca de 30 espécies, das quais 10 têm importância em medicina veterinária e humana (Bates, 2007).

As espécies são agrupadas em complexos, geograficamente dispersos, nos países do Novo Mundo (América) e nos países do Velho Mundo (África, Ásia e Bacia do Mediterrâneo), dos quais se referem:

Complexo *Leishmania major* engloba *L.(L.) major* que infecta preferencialmente roedores e marsupiais no norte do Sahara, Próximo Oriente e Península Arábica e *L. (L.) tropica*, importante agente da leishmaniose cutânea no Homem no oeste da Europa, Índia, África e Tunísia.

Complexo *Leishmania donovani* que comporta as principais espécies causadoras de leishmaniose visceral. *L.(L.) donovani* que prevalece em Timor, África, Índia e partes do Médio Oriente e *L.(L.) infantum* que prevalece nos países da Bacia do Mediterrâneo e no oeste de África (Fraga *et al.*, 2009).

Leishmania (L.) infantum, no Velho Mundo e *L. (L.) chagasi* no Novo Mundo são indistinguíveis (Dantas-Torres, 2006), assim como *L. (L.) donovani* e *L. (L.) archibaldi* em África (Cortes *et al.*, 2006).

A identificação e classificação de espécies *Leishmania* spp. poderá divergir consoante as técnicas utilizadas. Entre as técnicas existentes, sequenciação de microssatélites, estudos isoenzimáticos e genéticos, a tipagem isoenzimática tem sido considerada *golden standard* (Cortes *et al.*, 2006; Fraga *et al.*, 2009).

A tipagem isoenzimática engloba a técnica de electroforese enzimática de *multilocus* (MLEE) a partir da qual se obtêm zimogramas (matriz contendo um conjunto de bandas coradas de isoenzimas do parasita). Os protozoários que apresentam zimogramas semelhantes são classificados em zimodemes de uma determinada espécie. Devem ser examinados pelo menos 12 enzimas, para que estes estudos sejam validados (OIE, 2008).

Leishmania infantum foi subdividida em zimodemes MON, tendo sido identificados 38 zimodemes. Na Bacia do Mediterrâneo e em Portugal, o zimodeme frequentemente envolvido na LCan, na leishmaniose visceral humana bem como na infecção dos animais silvestres e vectores é o MON-1. Não obstante, em Portugal, outros zimodemes menos comuns têm sido detectados, MON-98 responsável por infecção canina (Cardoso *et al.*, 2002) e zimodemes MON-24, MON-18, MON-29 e MON-80 presentes em humanos imunocomprometidos. No entanto, cada vez mais se considera o uso de técnicas moleculares em estudos taxonómicos intra-específicos, na genética de populações e no diagnóstico. (Campino *et al.*, 2006; Cortes *et al.*, 2006; Alvar *et al.*, 2008).

Sofia Cortes *et al.* (2006), utilizando reacção em cadeia da polimerase - *restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) de ADN cinetoplastideal (KADN) analisou a diversidade genética de *Leishmania infantum* em humanos, canídeos e vectores em algumas áreas geográficas de Portugal, referindo 11 genótipos diferentes (A; B; C; D; E; F; G; H; I; J; L; M).

O kDNA é essencial na função genética do mitocôndria do parasita e permite trabalhar com cerca de 10.000 minicírculos e 800 pares de bases.

2.2. Morfologia

Leishmania é um organismo pleomórfico, ou seja, apresenta duas formas evolutivas (Fig. 4A): a forma amastigota, intracelular obrigatória e desprovida de mobilidade, que se encontra principalmente nos macrófagos de vertebrados (Fig. 4B), e a forma promastigota (Fig. 4C), extra-celular, provida de movimento, que se encontra no hospedeiro invertebrado (Silva, 2007)

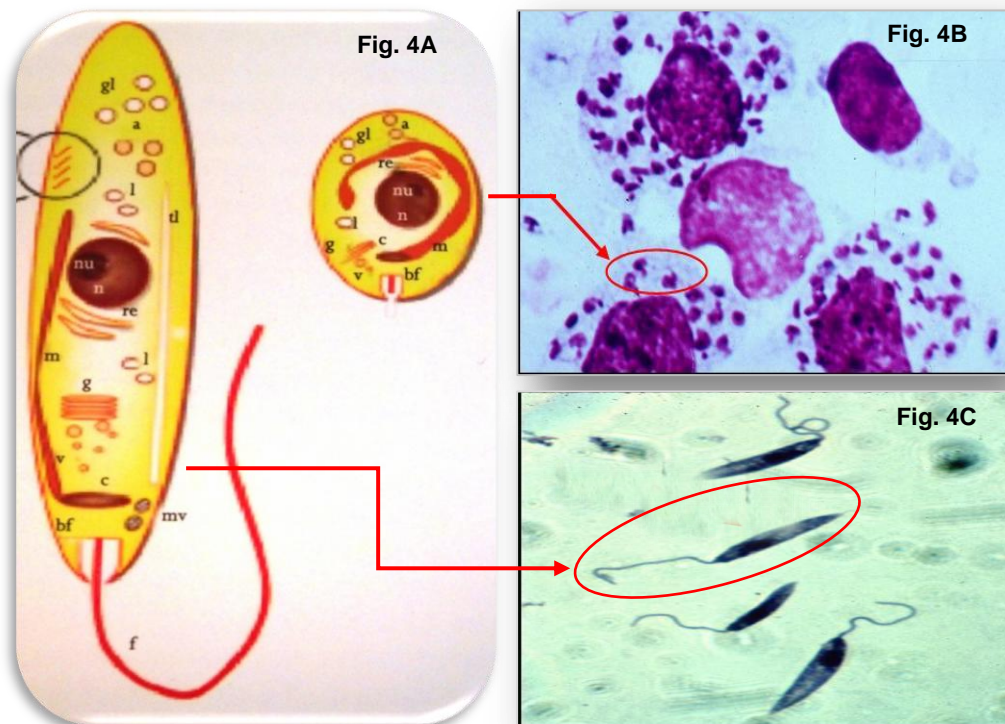


Fig. 4A: Representação esquemática dos diferentes organelos da forma amastigota e promastigota. Formas amastigotas (**Fig. 4B**) e promastigota (**Fig. 4C**) de *Leishmania*, num esfregaço de medula óssea com ampliação (x1000) (Laurenti, 2009)

Legenda:

Bolsa flagelar (Bf); cinetoplasto (c); flagelo (f); complexo de Golgi (g); glicossomas (gl); lisossomas (l); mitocôndria (m); microtúbulo (mt); corpos multivesiculares (mv); núcleo (n); retículo endoplasmático (re); compartimento-lisossômico (tl); vesículas de endocitose e exocitose (v) (Tomás & Freitas Romão, 2008)

Para a observação microscópica de promastigotas e amastigotas é necessário efectuar coloração, os métodos de Giemsa, Wright ou Leishman são os mais utilizados.

A forma amastigota é ovóide, medindo 2,5-5 µm de comprimento e 1,5-2 µm de largura. Apresenta citoplasma, núcleo com forma oval e cinetoplasto (cineto = movimento) com forma bastoniforme, localizado entre o núcleo e a bolsa flagelar. Contrariamente ao que se pensava, o cinetoplasto não está na origem da mobilidade do promastigota mas corresponde efectivamente ao ácido desoxirribonucleico (ADN mitocôndrial) que condensa numa única região da célula perto da origem do flagelo (Andrade *et al.*, 2006).

A forma promastigota apresenta um corpo fusiforme alongado, com 15-30 µm de comprimento (se incluído o flagelo) e 2-3 µm de largura. O flagelo na região anterior, bem desenvolvido, pode atingir 20 µm de comprimento (Ciaramella & Corona, 2003a).

A maior parte das estruturas intracelulares são semelhantes nas duas formas, como demonstra o esquema acima referido. De citar ainda a presença de uma membrana celular tripla, com invaginação, a partir do qual se forma o flagelo (*zonula adherens*) e o esqueleto, constituído por

um conjunto de microtubulos de tubelina interligados, com disposição longitudinal e transversal, que permite dar forma à célula e controlar o tráfego vesicular com o exterior na aquisição de nutrientes.

O estudo da estrutura do parasita é alvo de inúmeras investigações por parte de laboratórios na tentativa de disponibilizar meios para combater a doença (Miles *et al.*, 2005).

2.3. Replicação e genoma

Os organismos do género *Leishmania* são diplóides, mas replicam-se por divisão binária. A descoberta da existência de híbridos de *Leishmania* indica a possibilidade de ocorrer reprodução sexuada dentro do vector, contudo, se existir deve ser rara e incapaz de alterar a estrutura clonal das populações. O processo de multiplicação inicia-se com a divisão do cinetoplasto seguido do flagelo e do núcleo (Tomás & Freitas Romão, 2008).

A sequenciação do genoma de *L. infantum* está quase completa. Apresenta uma constituição de 36 cromossomas e cerca de 8.195 genes (Dujardin, 2009).

3. Ciclo biológico de *Leishmania*

Leishmania é um parasita com ciclo de vida heteroxeno (Fig. 5), isto é, parte do seu desenvolvimento ocorre num hospedeiro invertebrado e o restante num hospedeiro vertebrado (Eichner, 2009).

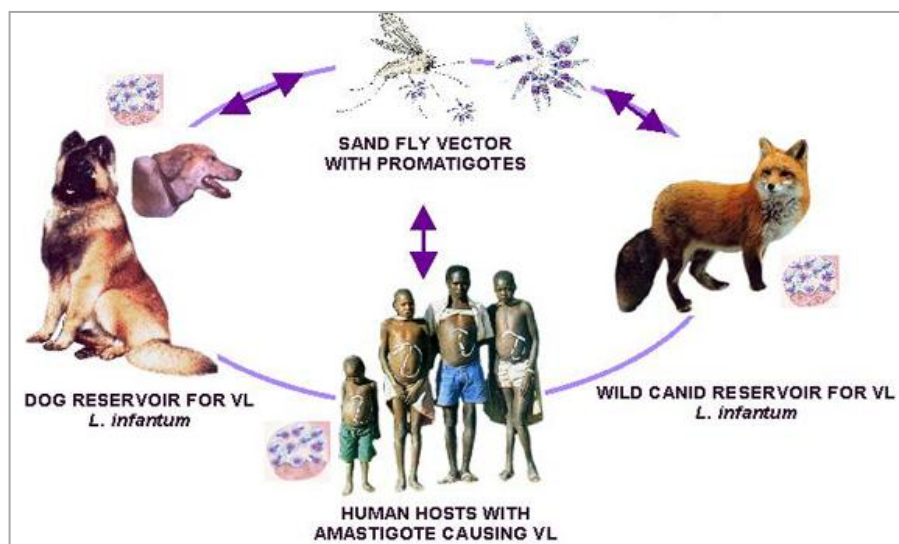


Fig. 5: Ciclo de vida de *Leishmania* (The Hebrew University - Hadassah Medical School, Jerusalem)

A maior parte das leishmanioses têm carácter zoonótico, ou seja, a infecção pode acometer o homem, apesar de outras espécies de animais constituírem o reservatório principal do parasita. Quando o reservatório animal desaparece e o único hospedeiro é o homem, o ciclo designa-se antroponótico. Quando o homem passa a ter um papel activo no ciclo de transmissão do parasita, o ciclo designa-se antroponozoonótico (Collin *et al.*, 2009; Luiz *et al.*, 2009).

3.1. Desenvolvimento de *Leishmania* no vector

As formas amastigotas, encontrando-se dentro de macrófagos ou livres na corrente sanguínea do hospedeiro infectado, são ingeridas pelo insecto quando se alimenta do seu sangue. Após a sua ingestão, sucedem-se um conjunto de transformações ao nível do intestino do insecto (Eichner, 2009).

Numa primeira fase, na porção posterior do intestino médio, a membrana peritrófica (estrutura em forma de saco, essencialmente constituída por quitina) envolve o sangue ingerido (Fig. 6). Esta membrana, segregada pelo insecto, visa proteger o epitélio intestinal dos possíveis agentes infecciosos, contudo, protege também os parasitas da acção directa das proteases intestinais (Tomás & Freitas Romão, 2008).

Sequencialmente, os amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicos e posteriormente em promastigotas nectomonas, formas que iniciam a migração para a região anterior do intestino médio, onde a membrana peritrófica é digerida pelo parasita por secreção de quitinases (Rotureau, 2006). Os nectomonas formados aderem à parede epitelial do intestino através dos flagelos, de modo a evitar a sua eliminação pelo intestino posterior juntamente com as fezes e/ou restos de alimento não digerido.

Posteriormente, os nectomonas diferenciam-se em diversas formas ou estágios: promastigotas leptomonas, com capacidade de divisão celular e haptomonas, que se fixam à válvula estemodeal provocando a sua degenerescência (Fig. 6) (Tomás & Freitas Romão, 2008).

Na última parte do ciclo, a elevada densidade de parasitas, o pH baixo, a anaerobiose e a falta de nutrientes disponíveis induzem a metaciclogénese (Rotureau, 2006; Eichner, 2009). Os amastigotas metacíclicos formados atingem o probóscis e penetram no hospedeiro vertebrado, aquando de uma nova refeição (Tomás & Freitas Romão, 2008). O insecto pode regurgitar de 1 a 1000 metacíclicos, dando assim continuidade ao ciclo (Almeida *et al.*, 2003).

A perda funcional da válvula estemodeal, juntamente com a oclusão parcial do lúmen intestinal causada pelos parasitas e por uma matriz de fosfoglicanos segregada pelos leptomonas, impede o insecto de realizar refeições completas, obrigando o insecto a efectuar refeições sucessivas na tentativa de obter a quantidade de sangue de que necessita, maximizando assim a capacidade infectante (Tomás & Freitas Romão, 2008).

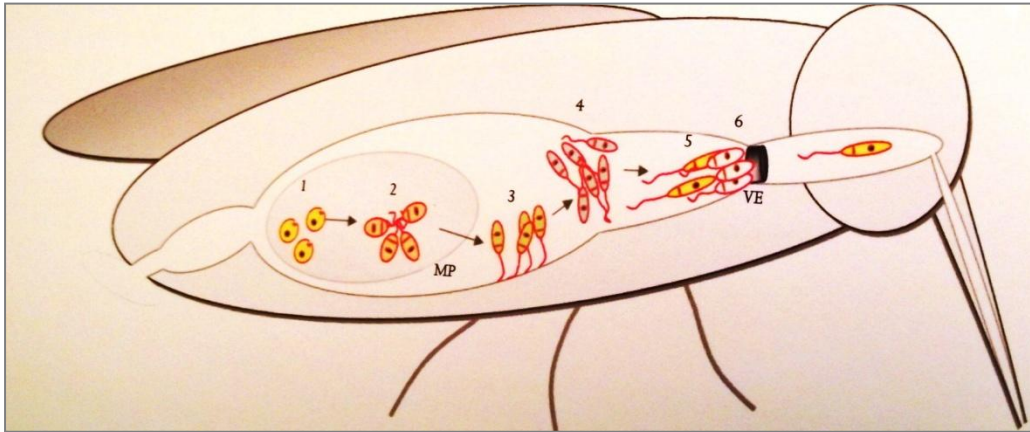


Fig. 6: Representação esquemática do desenvolvimento intravectorial de *Leishmania*. (Tomás & Freitas Romão, 2008)

Legenda: Amastigotas (1); amastigotas procíclicos (2); nectomonas (3); leptomonas (4); promastigotas metacíclicos (5); haptomonas (6); membrana peritrófica (MP); válvula estomodeal (VE).

3.2. Desenvolvimento de *Leishmania* no hospedeiro mamífero

3.2.1. Inoculação de Promastigotas metacíclicos

No cão, as principais zonas atingidas pela picada do díptero são as mais glabras (focinho, orelhas e abdômen). O díptero não introduz o parasita directamente nos vasos sanguíneos, antes utiliza as suas mandíbulas para rasgar a pele, recolhendo depois o sangue da gotícula que se forma, ao mesmo tempo que deposita os promastigotas metacíclicos. Aquando da alimentação, o flebótomo regurgita anticoagulantes e vasodilatadores presentes na saliva que facilitam este processo (Tomás & Freitas Romão, 2008).

Uma vez introduzidos no hospedeiro, os promastigotas metacíclicos diferenciam-se em amastigotas e apesar de apresentarem um grande tropismo para os macrófagos podem ser fagocitados por outras células dendríticas (Naderer *et al.*, 2008).

Os amastigotas podem ser encontrados nas células do sistema fagocítico mononuclear (SMF), das quais se destacam as células de Langerhans, células de Kupffer, monócitos e macrófagos (Eichner, 2009).

A inoculação experimental de culturas de promastigotas demonstrou que a diferenciação em amastigotas ocorre entre 30 minutos e 24 h após a infecção (Santos-Gomes *et al.*, 2000).

3.2.2. Internalização do parasita

Numa primeira fase, ocorre a internalização do parasita através de fagocitose, iniciada com a adesão do parasita ao fagócito. Esta pode ocorrer através da ligação directa de moléculas do parasita aos receptores das células hospedeiras ou, em alternativa, o agente infeccioso pode, primeiramente, ser revestido por proteínas do hospedeiro designadas opsinas (como por

exemplo, o complemento ou anticorpo) e só posteriormente aderir à célula, através de receptores próprios para estas proteínas. As duas situações podem ocorrer, dada a multiplicidade dos receptores e elementos de ligação utilizados, que diferem consoante as espécies de *Leishmania* e a própria forma do parasita (promastigota ou amastigota) (Tomás & Freitas Romão, 2008).

Entre os mais referidos receptores do macrófago que participam no processo de fagocitose das formas promastigotas destacam-se os do complemento CR1 e CR3, de manose-fucose (MFR), de fibronectina (FN) e os receptores para produtos finais de glicolisação.

A selecção de determinados receptores, por parte dos promastigotas, inicia toda uma cascata de reacções de sinalização, fundamental para que o parasita possa infectar com sucesso o hospedeiro vertebrado. A penetração preferencial do metacíclico, através do receptor do complemento CR3, induz uma baixa produção de radicais de oxigénio por parte do macrófago parasitado que facilita a sobrevivência de *Leishmania* (Tomás & Freitas Romão, 2008).

Quanto às opsinas, os factores de complemento C3b e C3bi parecem ser os mais utilizados pelos promastigotas.

Na sua superfície, o parasita expressa vários glicoconjugados, que podem fixar as opsinas ou ligar directamente a proteínas dos macrófagos. Destacam-se a metaloprotease (GP63) e o lipofosfoglicano (LPG), encontrando-se este último apenas em promastigotas (Spath *et al.*, 2003; Naderer *et al.*, 2008).

Usando a sua actividade enzimática, GP63 transforma o factor C3b em C3bi, um componente incapaz de activar o complemento. Revestido pelo C3bi, o promastigota penetra nos macrófagos através da proteína CR3 ou directamente através de outros receptores como o MFR (Tomás & Freitas Romão, 2008).

3.2.3. Diferenciação das formas promastigotas

Uma vez terminada a internalização, a diferenciação de promastigota para amastigota determina o passo seguinte, sendo essenciais factores como a temperatura, pH e inibição da fusão fagossoma-lisossoma. A inibição da fusão mediada pela acção do LPG visa proteger os promastigotas das hidrolases lisossómicas, criando condições para que ocorra a sua diferenciação em amastigotas.

Os lisossomas são organelos citoplasmáticos ricos em enzimas, com capacidade hidrolítica e de degradação de agentes infecciosos. Uma vez diferenciado em amastigota, o LPG é degradado e o fagossoma torna-se então fagolisossoma, prosseguindo desta forma o desenvolvimento de *Leishmania* (Spath *et al.*, 2003; Tomás & Freitas Romão, 2008).

3.2.4. Desenvolvimento de amastigotas nos macrófagos

O ambiente inóspito dos fagolisossomas torna-se vantajoso uma vez que *Leishmania*, para além de conseguir sobreviver, nele adquire os nutrientes que advêm dos processos digestivos dos lisossomas (Besteiro *et al.*, 2008). Aminoácidos, poliaminas, glicose, metais e nucleósidos são internalizados através de uma série de transportadores existentes na membrana do amastigota e capazes de competir com transportadores análogos presentes na parede do fagolisossoma.

As proteínas, péptidos ou outro tipo de macromoléculas penetram através de receptores localizados na bolsa flagelar. Entre as moléculas, é importante referir as do complexo major de histocompatibilidade (MHC-II), não se sabendo com exactidão se a sua internalização contribui para a obtenção de nutrientes, certamente permite ao parasita impedir a apresentação dos seus antígenos e assim escapar à resposta imune do hospedeiro (Nadere *et al.*, 2008; Tomás & Freitas Romão, 2008).

Uma ATPase presente na membrana celular do parasita permite-lhe regular o pH intracelular mantendo-o neutro (Tomás & Freitas Romão, 2008). Por outro lado, o pH do fagolisossoma (pH 5 a 6) optimiza a actividade das proteínas de membrana do parasita (transportadores ou enzimas).

Evidencia-se, assim, que a resposta imune e os processos metabólicos dos nutrientes têm um profundo efeito na determinação da replicação e evolução da infecção. Todavia, para além destas adaptações, o organismo desenvolveu outros processos para evitar a evasão dos mecanismos microbicidas do macrófago.

Leishmania é capaz de provocar um aumento de fosfatases de tirosina do macrófago, impedindo o funcionamento de muitas cinases que desencadeariam mecanismos de defesa (Tomás & Freitas Romão, 2008).

Algumas espécies de *Leishmania* são capazes de penetrar e sobreviver durante algum tempo nos neutrófilos (sem ocorrer replicação), que são as primeiras células a chegar ao local de infecção (Nadere *et al.*, 2008). Durante este período ocorre aporte de macrófagos para o local parasitado, com capacidade para fagocitar os neutrófilos, ocorrendo a entrada de parasitas para o interior do macrófago sem activar os seus mecanismos microbicidas e sem provocar a libertação de citocinas, permitindo desta forma a sobrevivência dos promastigotas (Allenbach *et al.*, 2006; Nadere *et al.*, 2008).

Outra ocorrência interessante diz respeito ao aumento do tempo de sobre-vida dos neutrófilos até vários dias, depois de infectados.

Um estudo comprovou experimentalmente que a apoptose pode ser prorrogada por incubação *in vitro* com aplicação de citocinas IL-8 IL-1, glicocorticóides ou produtos bacterianos, similarmente à infecção por *Leishmania* (Aga *et al.*, 2002).

Finalmente os amastigotas, depois de se replicarem nos macrófagos libertam-se por lise celular ou exocitose para parasitar novas células.

Apesar de existir uma série de estratégias para limitar a acção microbicida das células hospedeiras, o animal consegue muitas vezes impedir o estabelecimento do parasita (Allenbach *et al.*, 2006).

3.3. Transmissão não vectorial

Experimentalmente demonstrou-se que, homogeneizados de ectoparasitas como *Rhipicephalus sanguineus* quando infectados com *Leishmania* possuem capacidade infectante em hamsters quando administrados por via intraperitoneal ou por via oral (Otranto *et al.*, 2010). Por outro lado, estudos indicam que cães infectados poderão transmitir agentes patogénicos aos artrópodes vectores (Cardoso, 2009), o que poderá explicar o endemismo de leishmaniose em certas regiões da América do Sul, onde não existem vectores transmissores. No entanto, é necessário demonstrar se estes artrópodes têm capacidade de transmitir *Leishmanias* a um canídeo durante a sua alimentação em condições naturais (Otranto *et al.*, 2009).

Dados experimentais revelaram a possibilidade de infecção via trans-placentária no ciclo de *Leishmania*, conforme demonstrado em ratinhos e cachorros congenitamente infectados, assim como através do isolamento de amastigotas de *Leishmania* no útero de uma cadela (Smith, 2008).

A observação de cortes histológicos em cães infectados com leishmaniose demonstrou lesões genitais (epididimite e balanopostitis). Demonstrou-se ainda, presença de amastigotas em sémen, evidenciando possível transmissão aquando da cópula (venérea). Este tipo de transmissão já foi descrito num casal de humanos e está a ser estudado em cães no sentido de averiguar a sua importância epidemiológica (Diniz *et al.*, 2005)

Foi ainda documentada a transmissão horizontal, através de transfusão de sangue em raposas nos U.S.A (Katherine *et al.*, 2008) e pelo uso comum de agulhas em toxicodependentes (Diniz *et al.*, 2008).

4. O vector

Wenyon, em 1911, observou a relação entre o aparecimento das lesões de leishmaniose (principalmente em zonas sem pêlo) e a distribuição geográfica e sazonal do flebótomo. A sua reflexão foi confirmada experimentalmente por Sergent, Parrot Donatier e Beguet em 1921 (Eichner, 2009).

Os flebótomos constituem, assim, o grupo de insectos responsáveis pela transmissão de leishmaniose (Rosenthal & Marty, 2009).

São classificados taxonomicamente, (Tab. 3) de acordo com Loew (1845):

Tabela 3: Classificação taxonómica do insecto vector (Laura *et al.*, 2005)

Reino	Animalia	Sub-ordem	Nematocera
Filo	Arthropoda	Família	Psychodidae
Classe	Insecta	Sub-família	Phlebotominae
Sub-classe	Pterygota	Género	Phlebotomus
Ordem	Diptera		Lutzomyia

Geralmente, não ultrapassam os 5 mm de comprimento e apresentam uma cor castanho-amarelado (Fig7). Possuem pernas longas e delgadas e o corpo apresenta filamentos pilosos, ao contrário dos outros dípteros. As asas ostentam uma posição erecta, mesmo em repouso. O voo é silencioso e “saltitante” e a sua área de dispersão é relativamente pequena (Camargo & Basano, 2004).



Fig. 7: Fêmea do género *Phlebotomus* (Adaptado Rosenthal & Marty, 2009)

Entre as 700 espécies e 13 géneros conhecidos (Afonso & Alves-Pires, 2008), apenas perto de 70 espécies são importantes em medicina veterinária e humana: cerca de 40 espécies do género *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, África, Médio Oriente e Ásia) e 30 do género *Lutzomyia* no Novo Mundo (América) (Amóra *et al.*, 2009).

Nas regiões tropicais, o flebótomo é activo durante todo o ano. Em Portugal e noutros climas temperados do hemisfério norte observam-se no período de Maio a Outubro, com actividade principalmente ao crepúsculo e durante a noite, permanecendo durante o dia nos seus abrigos (Rosenthal & Marty, 2009). São sensíveis à humidade baixa e a temperaturas extremas, estando o seu desenvolvimento e sobrevivência comprometidos nestas condições.

A monitorização das variáveis meteorológicas e ambientais em relação às referências espaciais e temporais do vector permite aplicar programas de controlo e delinear estratégias de prevenção da infecção de LCan (Fig. 8) (Galvez *et al.*, 2010).

Estudos laboratoriais demonstraram que *P. ariasi* sobrevive bem a temperaturas compreendidas entre os 5°C e os 30°C, enquanto *P. perniciosus* é activo a temperaturas compreendidas entre 15°C e 28°C. Sabe-se ainda que a densidade do vector diminui em função da altitude, sendo raramente observado em altitudes acima dos 600 ou 700 metros (Abrantes & Silveira, 2009). Contudo, existem registos destes insectos a 3300 metros de altitude, no Afeganistão (Afonso & Alves-Pires, 2008).

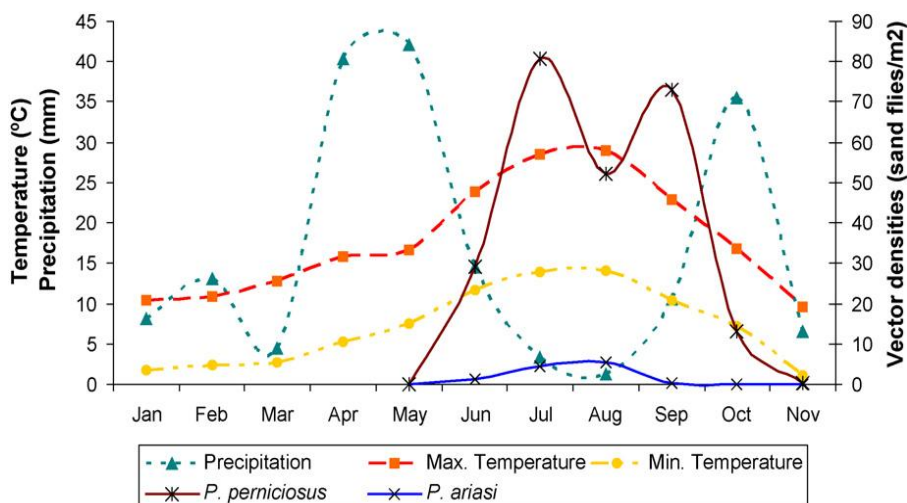


Fig. 8: Densidade do vector em relação às variáveis meteorológicas (Galvez *et al.*, 2010)

No hospedeiro invertebrado, o tempo para *Leishmania* completar o seu ciclo é variável entre os 4 e os 20 dias, dependendo da espécie e das condições climáticas.

A temperatura mais favorável para o desenvolvimento de *L. infantum* nos vectores é de 25°C (Abrantes & Silveira, 2009). Sabe-se no entanto, que temperaturas mais elevadas (dentro dos limites de tolerância) aceleram o desenvolvimento e a maturação do parasita no insecto e aumentam também a probabilidade de sobrevivência da fêmea.

Como o ciclo de vida do insecto dura em média 30 dias, verifica-se que existe a possibilidade de inocular o parasita no hospedeiro vertebrado durante 2 a 3 semanas (Eichner, 2009).

A picada do flebótomo é do tipo telmofágico. A fêmea, ao efectuar uma refeição sanguínea produz inicialmente um micro-hematoma, no hospedeiro vertebrado, através do qual o sangue é sugado e ingerido: “pool feeding”. Contrariamente, os mosquitos inserem as suas peças bucais e sugam directamente dos capilares sanguíneos do hospedeiro: “capillary feeding” (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Apenas as fêmeas de flebótomos transmitem o parasita, pois só estas necessitam de efectuar refeições sanguíneas para desenvolver o ciclo gonotrófico (maturação dos ovos na época de postura). Os machos apenas se alimentam dos sucos vegetais.

As fases preimaginais (ovo, 4 estados larvares e pupa) desenvolvem-se no meio terrestre, todavia, necessitam de zonas húmidas ricas em matéria orgânica para se alimentarem e protegerem (fendas, tocas, troncos ocos de árvores, cabanas e celeiros) (Rosenthal & Marty, 2009).

Outrora, espécies com ecologias específicas (copa das árvores e zonas naturais) adaptaram-se às condições urbanas e peri-urbanas, explorando a acumulação de matéria orgânica produzida pelas pessoas ou animais (lixeiros). A nova distribuição do vector pode condicionar um grave problema de saúde pública (Dantas-Torres & Brandão Filho, 2006).

Actualmente, existem diversos tipos de biótopos relacionados com as diferentes espécies, encontrando-se flebótomos tanto no interior de casas (endófilos) como no exterior (exófilos) (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Em Portugal, as principais espécies de vectores envolvidas e comprovadas na transmissão entre hospedeiros vertebrados, por identificação da forma promatigotas de *Leishmania infantum*, são *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* (Newstead, 1911) e *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* (Tonnoir 1921) (Cortes *et al.*, 2007). No entanto, são também frequentemente capturadas espécies como *Sergentomyia minuta*, *P. papatasi* e *P. sergenti*.

Conforme referenciado na literatura, as duas últimas espécies de flebótomos referidas manifestam capacidade de transmitir *L. trópica* e *L. major*, o que possibilita uma possível introdução destas espécies em Portugal (Maia *et al.*, 2009). Por outro lado, devido ao aquecimento global, em Portugal verifica-se a tendência para diminuir o período de diapausa e aumentar a distribuição dos vectores, o que pode implicar aumento da actividade flebotómica e concomitantemente a incidência da doença (Campino *et al.*, 2010).

5. Epidemiologia da leishmaniose canina

Leishmaniose é uma zoonose tendencialmente endêmica nas regiões tropicais e subtropicais. Presente em 88 países, prevalece na América Latina, algumas regiões de África, Médio Oriente e China. Nestas regiões, onde vectores e mamíferos co-habitam, existem condições favoráveis ao desenvolvimento e disseminação do vector, perpetuando a transmissão do parasita (Garrote *et al.*, 2004; Laurent *et al.*, 2009). A Leishmaniose Visceral Humana é considerada a forma mais severa da doença. Dos 500.000 casos anuais reportados em todo o mundo, cerca de 90% reportam-se a cinco países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (Fig. 9) (Dantas-Torres *et al.*, 2006).

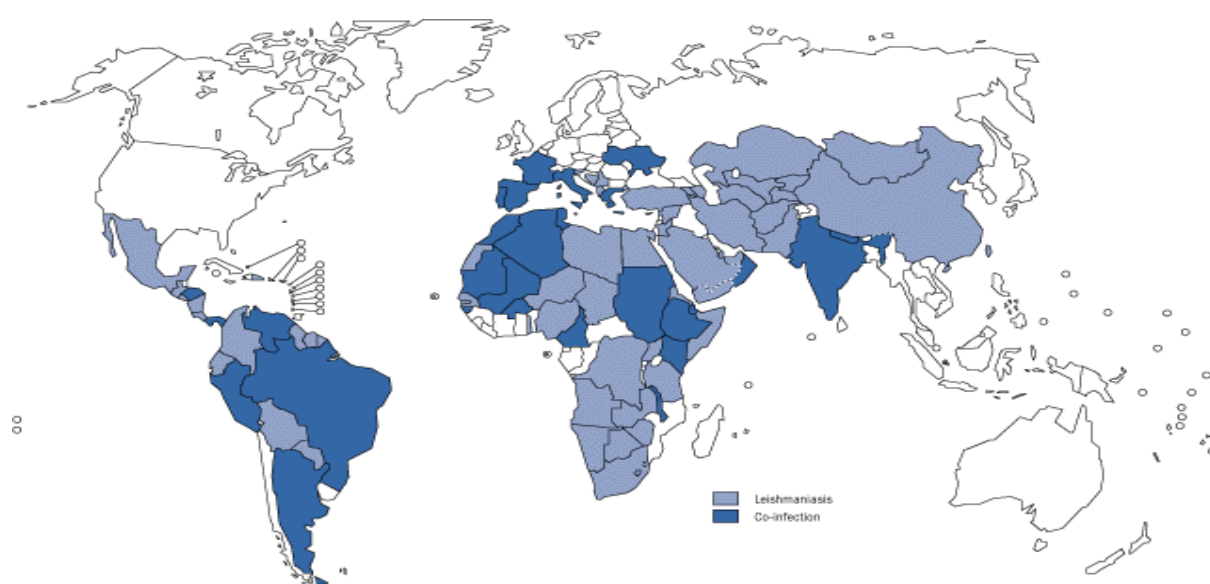


Fig. 9: Mapa da distribuição geográfica da leishmaniose e da co-infecção, leishmania/VIH (1990-1998)

Fonte: http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/index.html

No Velho Mundo, podem encontrar-se cinco espécies patogénicas preponderantes: *Leishmania donovani*; *Leishmania infantum*; *Leishmania trópica*; *Leishmania aethiopica* e *Leishmania major* (Laurent *et al.*, 2009).

Em relação à Bacia do Mediterrâneo, considerada endêmica desde 1908 (Ziad *et al.*, 2002) constatou-se uma variação de prevalência entre os 1.1% e 48.4% (Papadopoulou *et al.*, 2005). *Leishmania infantum* é a espécie predominante e o agente responsável pela maioria dos casos de leishmaniose visceral humana e de leishmaniose canina (Ben-Ahmed *et al.*, 2009).

Em média, ocorrem todos os anos 700 novos casos de leishmaniose em humanos (3950 se a Turquia estiver incluída). No entanto, estima-se que por cada caso notificado ocorram 30 a 100 casos assintomáticos não registados (Dujardin *et al.*, 2008).

Estudos realizados em Espanha, França, Itália e Portugal, baseados em valores de seroprevalência, estimaram nestes países, 2,5 milhões de cães infectados com *Leishmania infantum* (Campino *et al.*, 2010b; Luiz *et al.*, 2009). Porém, a determinação exacta do número de cães infectados é difícil de calcular, não apenas devido ao longo e variável período de incubação (três meses a vários anos), mas também à existência de cães assintomáticos com possibilidade de assim o permanecerem por toda a vida (Campino *et al.*, 2010b). Através da Figura 10 podemos analisar as oscilações de prevalências entre regiões contíguas (Dujardin *et al.*, 2008).

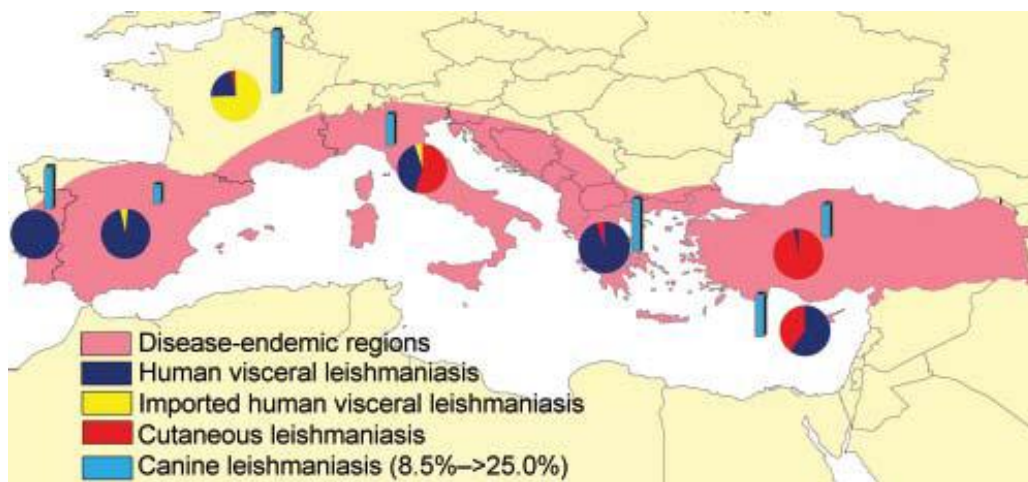


Fig. 10: Distribuição da prevalência de leishmaniose no sudoeste da Europa. (Dujardin *et al.*, 2008)

As técnicas de biologia molecular permitiram aferir dois conceitos importantes em relação à epidemiologia de Lcan em regiões endémicas. O primeiro é que a infecção é difundida, mas nem todos os cães infectados desenvolvem a doença e/ou são seropositivos. Um estudo efectuado em Palma de Maiorca confirma-o: 13% dos cães apresentavam sinais clínicos, 26% eram seropositivos e 63% positivos através da técnica de PCR (Fig. 11). Em Itália, dos 73 cães de caça estudados sem sinais clínicos, 12,3% apresentavam serologia positiva *versus* 63% positivos quando analisados através da técnica de PCR.

O segundo conceito verifica que, em regiões endémicas, a infecção se dispersa rápida e amplamente na população de canídeos existente, concluindo existir uma relação directa entre densidade de vectores e hospedeiros caninos com probabilidade de pelo menos um cão ser infectado.

Em Itália, verificou-se que uma população de cães quando colocada numa região endémica, expostos e sem protecção contra a picada do flebótomos, após três épocas consecutivas, 97,3% dos cães evidenciava resultados positivos através de PCR (Baneth *et al.*, 2008).

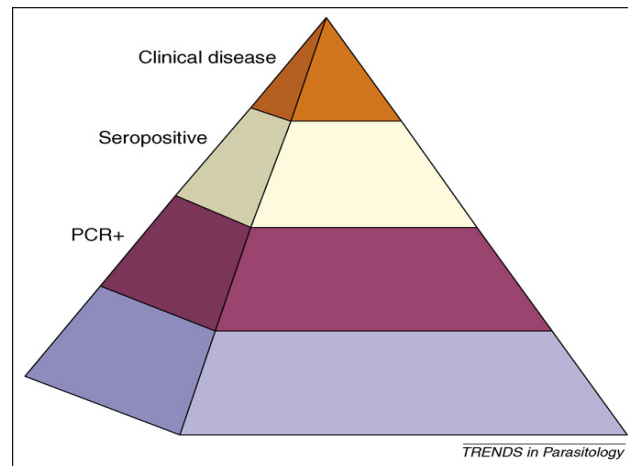


Fig. 11: Representação esquemática das diferentes proporções de animais infectados vs método de diagnóstico, numa população canina de região endémica (Baneth *et al.*, 2008)

Em regiões não endémicas, como a Europa do Norte e Central, onde não existem condições para o desenvolvimento do vector, registam-se cada vez mais casos de LCan. A mudança de restrições na quarentena, maior número de viagens e o aumento de animais de companhia importados têm sido considerados factores predisponentes para esta situação. Um estudo holandês afirma que viajam anualmente 58.000 cães com os seus proprietários com destino a zonas consideradas endémicas, sendo o risco de adquirir leishmaniose de 0,027%-0,23% (Dujardin *et al.*, 2008).

5.1. Epidemiologia da LCan em Portugal

Em Portugal, o primeiro caso de leishmaniose foi descrito em 1910, numa criança de nove anos de idade, residente em Lisboa. A doença tem sido considerada predominantemente infantil, mas verifica-se uma tendência para a diminuição do número de casos em crianças e o aumento da infecção em adultos, principalmente associada a casos de VIH/SIDA.

Desde o início de 2000 até ao final de 2009 foram diagnosticados laboratorialmente, na Unidade de leishmaniose do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), 173 novos casos de L.V.H, dos quais 20 adultos imunocompetentes e 107 adultos imunocomprometidos.

Em Portugal, ao contrário de outros países da Europa, a introdução da terapêutica anti-retroviral HAART em pacientes com VIH não diminuiu a incidência da infecção. Por outro lado, as manifestações clínicas atípicas são frequentes, com o envolvimento de tecidos e órgãos não usualmente atingidos, como a pele, sangue periférico, tubo digestivo e pulmões (Campino & Maia, 2010).

Em relação à leishmaniose canina, o número de casos tem vindo a aumentar, com prevalências que podem atingir cerca de 20% em regiões endémicas. A doença está incluída desde 2002, no grupo das infecções de notificação obrigatória (Campino & Maia, 2010).

Em 2006, na Região do Algarve, um estudo de seroprevalência detectou valores significativos de anticorpos anti-*Leishmania* em 28.8% dos animais estudados (Campino & Maia, 2010). Contudo, alguns focos endémicos podem atingir valores de seroprevalência de 60% a 80% (Campino *et al.*, 2010b).

Com base em estudos de seroprevalência, em Portugal considera-se como zonas endémicas a a região de Trás-os-Montes e Alto Douro, a sub-região da Cova da Beira, o concelho da Lousã, a região de Lisboa e Setúbal, o concelho de Évora e o Algarve. Não obstante, outras áreas estão consideradas em risco, na medida em que podemos encontrar casos esporádicos de LCan na totalidade do território português (Fig. 12) (Campino *et al.*, 2010b).



Fig. 12: Mapa da prevalência de leishmaniose canina em Portugal (Campino *et al.*, 2010b)

5.2. Epidemiologia na população silvestre

Para além da espécie *Canis familiaris*, outras espécies de mamíferos podem ser infectadas com *Leishmania infantum*, como por exemplo a raposa (*Vulpes vulpes*), o chacal (*Canis aureus*), o lobo (*Canis lúpus*) (Dipineto *et al.*, 2007; Beck *et al.*, 2008), roedores, o Lince-ibérico (*Lynx pardina*) e os gatos (*Felis catus*) (Solano-Gallego *et al.*, 2007; Smith, 2008).

Estas espécies podem servir como reservatório secundário em regiões endémicas e potenciar um risco acrescido na perpetuação do ciclo (Beck *et al.*, 2008). No entanto, não está definida a influência do ciclo silvático na epidemiologia do ciclo doméstico, sendo necessário esclarecer se existe a capacidade de transmissão, do protozoário, entre o hospedeiro silvestre e o vector. Além disto, existem diferenças nos padrões de PCR-RFLP efectuados ao ADN de *L. infantum* presente nos canídeos silvestres e domésticos (Silva, 2009).

Outras espécies de mamíferos como o cavalo, o urso, o Canguru-vermelho, o Porco-espinho e o guaxinim podem ser infectadas por *Leishmania* spp. e constituírem, ocasionalmente, fonte de infecção para o Homem. Contudo, se não contribuírem significativamente para a sobrevivência, a longo prazo, da população de parasitas, não desempenham um papel importante na epidemiologia da doença, sendo considerados hospedeiros acidentais (Diniz *et al.*, 2008).

Em Portugal, Espanha e Itália foram efectuados vários estudos em populações de canídeos silvestres, tanto no seu habitat natural como em cativeiro que revelaram uma prevalência no lobo entre 9-20,5% e em raposas 14,1-40 % (Silva, 2009).

6. Patogenia

Leishmania, conforme anteriormente referido, sobrevive no hospedeiro devido aos factores de virulência intrínsecos como o LPG e o GP63, e por conseguirem resistir ao ambiente hostil recriado pelos macrófagos para destruir células fagocitadas.

Os mecanismos que o macrófago utiliza na destruição de células fagocitadas são a respiração oxidativa, acidificação e digestão. A respiração oxidativa “oxidative burst” parece ser o principal mecanismo leishmanicida, a fagocitose de um corpo estranho activa uma oxidase (NADPH), que promove a formação de compostos intermediários de oxigénio (compostos oxidativos) como o peróxido de hidrogénio, o ião superóxido e a síntese do óxido nítrico (NO). Estes compostos reagem com a membrana fosfolipídica do parasita e com as suas macromoléculas (Correia & Alexandra-Pires, 2008).

O tipo de resposta imunitária, própria de cada animal, mostra-se determinante na forma como a doença evolui, sendo os macrófagos e as células dendríticas de grande importância na modulação e regulação da resposta imunitária específica anti-*Leishmania* (Soong, 2008).

Em animais resistentes, os parasitas não apresentam capacidade de disseminação para além do linfonodo eferente. No entanto, a falha no desenvolvimento de uma resposta imunitária protectora permite a multiplicação e disseminação do local da infecção (pele) através dos

macrófagos para zonas como a medula, baço, fígado, articulações, sistema respiratório, sistema cárdio-respiratório e órgãos sexuais (Miró *et al.*, 2008).

Em animais resistentes, as células dendríticas, após transportarem formas de *Leishmania* da pele para o linfonodo eferente, têm a capacidade de estimular células T protectoras de memória, através do seu complexo de proteínas de classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHCII) (Correia & Alexandra-Pires, 2008). Na verdade, existe resposta celular predominante, que se inicia com o desempenho das células apresentadoras de antígeno (APC), que são normalmente macrófagos que fagocitaram de forma inespecífica o parasita e apresentam antígenos parasitários associados a moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II (MHC-II) na sua membrana externa. O complexo MHC-antígeno é reconhecido pelos receptores das células CD4⁺ que providenciam uma determinada resposta em função da sub-população de linfócitos que resulte maioritariamente activada. (Alexandre-Pires *et al.*, 2010)

A resistência ou susceptibilidade à infecção por *L. infantum* depende da capacidade dos linfócitos T proliferarem especificamente, e está dependente da predominância das subpopulações de linfócitos CD4⁺ T-helper (h1) ou Th2, respectivamente (Ferrer, 2002; Santos-Gomes *et al.*, 2003).

Os linfócitos Th 1 desempenham funções importantes na interacção com os macrófagos, ao promover a produção de citocinas como o Interferão gamma (IFN-γ), factor de necrose tumoral (FNT) e interleucinas IL-12 e IL-2 (Gollob & Dutra 2005; Corrales & Moreno, 2006).

Em culturas de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de canídeos assintomáticos ou de cães vacinados com protecção eficaz, verificava-se um padrão de linfócitos Th1 com produção de altos níveis de FNT-α, IL-2 e INF-γ (Martin & Diaz, 2004). Aquelas citocinas, principalmente IFN-γ induzem a activação dos macrófagos infectados, visando a destruição intracelular do parasita. O óxido nítrico, sintetizado a partir da L-arginina, é a principal molécula envolvida na actividade anti-*Leishmania* do macrófago, induzindo a apoptose dos amastigotas intracelulares (Fig. 13) (Campillo *et al.*, 1999; Baneth *et al.*, 2008; Ochoa *et al.*, 2009).

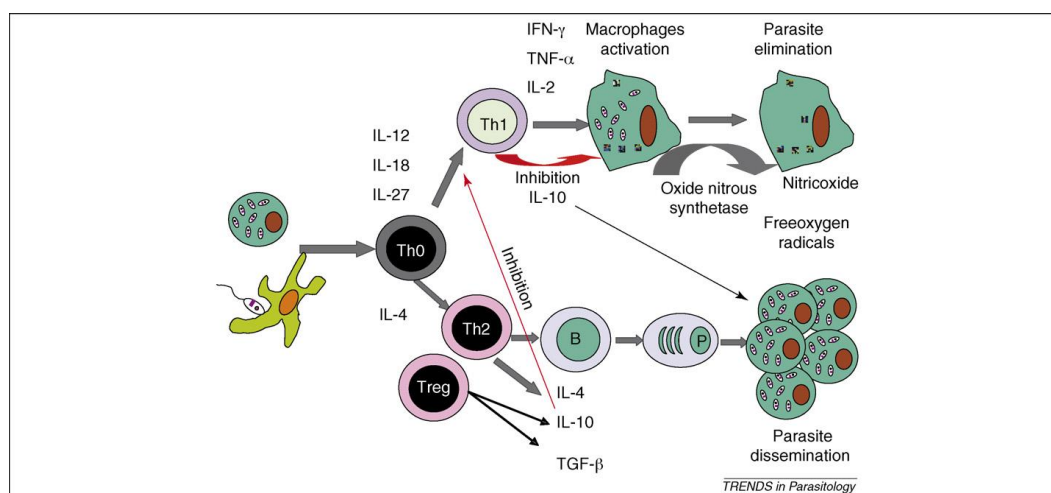


Fig. 13: Representação esquemática da interacção entre a proliferação de linfócitos do tipo Th1 e Th2, num cão com leishmaniose (Baneth *et al.*, 2008).

Outros estudos em murganhos demonstraram que a cura da infecção por *Leishmania major* ocorre quando a resposta imunitária é mediada por células T helper do tipo 1, caracterizada pela produção de IFN- γ , FNT- α , interleucinas (IL-2, IL-3, IL-12) e IgG2, opondo-se às situações de doença crónica ou fatal quando é mediada por células Th2, acompanhada pela produção de IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IgG1. Similarmente, esta resposta de carácter bivalente parece estar presente no cão infectado com *Leishmania infantum* (Branchelente & Welle, 2005). No entanto, esta dicotomia não é absoluta, sendo o equilíbrio entre estas duas respostas imunológicas que possivelmente determina o resultado da infecção em canídeos (Doctoral & Simó, 2009).

A maior parte dos canídeos parece desenvolver uma resposta celular nas fases iniciais da infecção, mas à medida que esta se desenvolve parece ocorrer imunossupressão e consequente perda de resposta mediada por células T (Rodriguez *et al.*, 2007).

Estudos recentes sugerem que a resposta imunológica perante a infecção por *Leishmania infantum* em canídeos pode ser compartimental e variar em função do órgão. Por exemplo, a produção de IL-10 (citoquina imunossupressora) e FGT- β , encontradas em canídeos e humanos, sintomáticos ou assintomáticos, parecem estar associadas à persistência do parasita no baço (Doctoral & Simó, 2009).

Sabe-se também que certas interleucinas, como a IL-4, reflectem a activação da resposta tipo Th2 com proliferação de linfócitos B e produção das imunoglobulinas IgE e IgG1 (James & Bryson, 2005). Às quais estão associados quadros clínicos graves, com elevadas cargas parasitárias na medula óssea e lesões de pele (Branchelente & Welle, 2005).

A avaliação do estado parasitário, imunológico e clínico após a inoculação de *Leishmania* em cães sub-clinicamente infectados demonstrou que a memória imunológica do hospedeiro, criada durante o primeiro contacto com o parasita determinou resistência à infecção por

Leishmania infantum no segundo contacto. Verificou-se, ainda, uma resposta imunológica mais eficaz, quando se procedeu à inoculação utilizando culturas de promastigotas obtidas em laboratório (Santos-Gomes *et al.*, 2003).

Estudos de anticorpos monoclonais, realizados em cães experimentalmente infectados, demonstraram que a IgM foi encontrada posteriormente à IgG, indiciando que a IgM não pode ser usada numa fase inicial para o diagnóstico de LCan e que a principal imunoglobulina produzida na LCan é a IgG, presente um a quatro meses após a infecção (Doctoral & Simó, 2009).

A IgE apenas é expressiva em animais com sinais clínicos, direccionando-a como marcador da doença activa. A IgA, também encontrada em cães com sintomatologia, está possivelmente associada à ocorrência de lesões nas mucosas (Maia & Campino, 2008).

De acordo com a carga parasitária e sinais clínicos, relacionou-se que IgG e IgA são as imunoglobulinas mais indicadas para o diagnóstico (Doctoral & Simó, 2009), sendo que IgG, IgA e IgM está presente em 64% dos cães com sintomatologia.

A melhora do estado clínico do canídeo após tratamento correlaciona-se com uma diminuição das concentrações de IgG anti-*Leishmania*, embora estas possam persistir por vários anos em baixas concentrações.

Apesar de todos os estudos efectuados, a correlação minuciosa entre as concentrações de IgG1 e IgG2 e as respostas do tipo Th2 ou Th1, respectivamente, não mostram um consenso absoluto (Maia & Campino, 2008).

7. Sinais clínicos e lesões da leishmaniose canina

Leishmaniose é uma doença sistémica e progressiva que teoricamente pode envolver qualquer órgão, tecido ou fluido biológico, repercutindo um anárquico padrão de sinais clínicos, desde a ausência de doença ao desenvolvimento de processos graves e fatais (Santos-Gomes *et al.*, 2003).

As manifestações clínicas estão directamente relacionadas com os múltiplos factores envolvidos. Em relação ao hospedeiro, podemos destacar a constituição genética, a intensidade e tipo de resposta imunitária e o estado nutricional. Em relação ao parasita, destaca-se a virulência/antigenicidade da espécie e zimodeme e também a capacidade de proliferação nos diferentes órgãos. Podemos, ainda, referir outros factores como as condições sanitárias e a fase evolutiva da doença (Campillo *et al.*, 1999; Alexandre-Pires *et al.*, 2010).

Segundo Bourdeau (1983) podem observar-se dois quadros clínicos: a forma aguda, raramente observada e própria dos animais jovens que apresentam temperaturas elevadas (40-41°C), sendo o prognóstico desfavorável com taxas de mortalidade muito elevadas. A outra forma de carácter crónico é típica da população adulta.

O quadro histopatológico encontrado nos tecidos e órgãos lesionados é frequentemente uma reacção inflamatória crónica, granulomatosa ou difusa, que está associado à infiltração de células inflamatórias como macrófagos, linfócitos e plasmócitos, e que normalmente evolui para processos degenerativos e necróticos (Campino *et al.*, 2002).

Por outro lado, os anticorpos no cão podem desencadear a produção de imunocomplexos circulantes que se depositam em várias estruturas como os glomérulos, vasos e articulações, provocando lesões (Silva, 2007).

As principais lesões ocorrem ao nível da pele, órgãos linfóides, rins e fígado (Campino *et al.*, 2002).

Em relação aos achados clínicos, podemos referir a perda progressiva de peso, linfadenomegália generalizada, atrofia muscular, onicogribose, intolerância ao exercício, diminuição do apetite, letargia, esplenomegália, lesões oculares, epistáxis e claudicação, conforme evidenciado na Tab. 4 (Baneth *et al.*, 2008).

Tabela 4: Sinais clínicos em cães com Lcan (adaptado de Baneth *et al.*, 2008)

Sinais clínicos	Percentagem (%)
Dermatite	81%-89%
Linfadenomegália	62%-90
Lesões oculares	16%-81%
Palidez das mucosas	58%
Esplenomegalia	10%-53%
Caquexia	10%-48%
Febre	4%-36%
Onicogribose	20%-31%
Anemia	27%
Epistáxis	6%-10%
Artropatias	3.2%- 4%
Ascite	1,3%-3%

7.1.Sistema tegumentar

As lesões cutâneas são as manifestações clínicas mais comuns (81%-89%) às quais estão associados vários quadros dermatológicos (Tab. 5).

Tabela 5: Lesões cutâneas em cães com leishmaniose (adaptado de Baneth *et al.*, 2008)

Lesões cutâneas	Percentagens (%)
Dermatite exfoliativa	56%-64.1%
Dermatite ulcerativa	34.4%-40%
Hiperqueratose nasal	18.8%
Hiperqueratose digital	14.1%
Dermatite nodular multifocal ou focal	2.3%-17%
Dermatite pustular	2%-13%

A dermatite exfoliativa não pruriginosa é caracterizada por alopecia difusa, simétrica e não pruriginosa que se inicia na cabeça, sobretudo na região peri-ocular (desenhando as *lunettes*) (Fig. 14), pavilhão auricular e plano nasal (Correia & Alexandra-Pires, 2008).

A dermatite nodular multifocal ou focal, pode ocorrer sob a forma de múltiplos granulomas de pequenas dimensões, geralmente acompanhados de despigmentação, sobretudo nos bordos das pálpebras.

A dermatite mucocutânea proliferativa surge principalmente nas mucosas da cavidade oral e apresenta um aspecto nodular proliferativo e irregular.

A dermatite ulcerativa, evidencia-se nas proeminências ósseas (Fig. 15) junções mucocutâneas, pavilhão auricular e prepúcio (Correia & Alexandra-Pires, 2008).



Fig. 14: Dermatite exfoliativa não pruriginosa na região peri-ocular e crostas na região nasal



Fig. 15: Dermatite ulcerativa, acompanhada de hiperqueratose na região tíbio-társica

As dermatites estão muitas vezes associadas a infecções bacterianas causando piodermatites superficiais ou profundas. Os agentes frequentemente envolvidos são bactérias estafilococos (Ciaramella & Corona, 2003a; Miró, 2005).

Pode ainda existir um conjunto de manifestações cutâneas sem um padrão típico, como despigmentação, paniculite, erupção pustular, acantose, crostas, dermatite liquenoide, paniculite, penfigo foliáceo e eritema multifocal.

Quando o vector se alimenta do hospedeiro, no local de inoculação (ponta do focinho, ou pavilhão auricular) observa-se em alguns animais uma reacção inflamatória, à qual se dá o nome de “cancro de inoculação” (Correia & Alexandra-Pires, 2008).

A natureza crónica das dermatites ou as recidivas constantes provocam uma hiperqueratose, comumente observada no focinho (Fig. 16), nas zonas de decúbito e nas almofadas plantares (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

É relativamente comum o crescimento exagerado e curvatura das unhas recebendo a denominação de “unhas de faquir”, “onicogrifose”, ou “unhas de cimatarra”. Esta alteração está associada à presença do parasita na matriz ungueal e à hipersensibilidade das almofadinhas plantares que dificulta o desgaste normal das unhas, Fig. 17 (Correia & Alexandra-Pires, 2008).



Fig. 16: Hiperqueratose e epistaxis ao nível do plano nasal

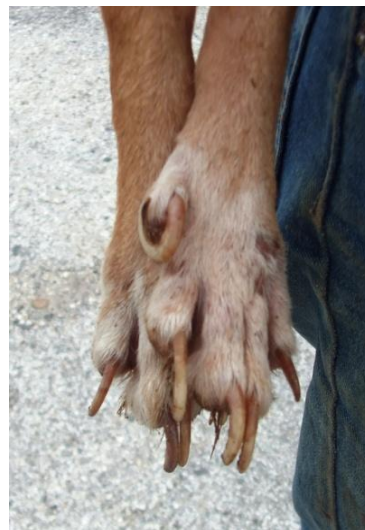


Fig. 17: Onicogrifose

7.2. Sistema hematopoiético

No exame físico é frequente detectar o aumento de tamanho generalizado dos linfonodos (linfadenomegália), que se apresentam sem aderências, indolores e de consistência aumentada. As lesões hipertróficas encontradas nos linfonodos e medula óssea são resultado

da proliferação linfoplasmohistiocitária. Os principais linfonodos envolvidos são os poplíteos, pré-escapulares e sub-maxilares.

Com a evolução da doença, ocorre tendencialmente regressão da adenopatia (Baneth *et al.*, 2008; Silva, 2007).

Em relação à medula óssea, as alterações macroscópicas permitem evidenciar uma consistência mais fluida que a normal e uma cor avermelhada (deposição de hemosiderina). A nível microscópico, evidencia-se uma mielopatia involutiva e não regenerativa, com depleção das séries eritroblástica, leucoblástica e megacarioblástica (Correia & Alexandra-Pires, 2008).

A esplenomegália é um sinal clínico difícil de detectar, especialmente se o aumento do baço for pouco exuberante ou se não dispusermos de meios auxiliares de diagnóstico apropriados. Numa fase crónica, o baço encontra-se atrofiado, com consistência aumentada e cápsula espessada (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

No baço ocorre reacção inflamatória crónica e difusa, com macrofagos organizados em granulomas e repletos de amastigotas (Silva, 2007).

Um estudo baseado na análise de baços de cães infectados denota profunda modificação na estrutura microvascular e imunológica, re-arranjo vascular, grande desenvolvimento das vénulas pulpare e o desaparecimento de sinusóides (Correia & Alexandra-Pires, 2008).

7.3. Sistema renal

A doença renal pode progredir até insuficiência renal crónica (IRC) e constitui a principal causa de morte dos animais com LCan. (Silva, 2007) O Médico Veterinário não deve esquecer o questionário base, direccionado para a patologia renal: presença de poliúria (11%) e polidipsia (4%-40%), vômito ou diarreia (Silva, 2009).

O diagnóstico precoce e a monitorização são fundamentais para prolongar a sobre-vida do animal (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A avaliação histopatológica revela tipicamente glomerulonefrite proliferativa, nefrite intersticial, esclerose glomerular, infiltrado inflamatório intersticial e fibrose (Ikeda Garcia *et al.*, 2007).

A glomerulonefrite membranoproliferativa é associada a doença renal crónica, enquanto cães sem evidência clínico-patológica revelam lesões de glomerulonefrite mesangioproliferativa (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Este último quadro lesional é comumente observado em humanos. Alguns estudos têm descrito a presença de lesões histopatológicas em 100% dos cães avaliados com LCan (Gaspar *et al.*, 2008).

7.4. Sistema digestivo e órgãos anexos

A diarreia apresenta uma prevalência que pode variar entre 3,5% e os 30%. A sua ocorrência pode estar associada à insuficiência renal, hepática ou à infiltração da mucosa intestinal por células parasitadas. Na histopatologia revela-se um infiltrado inflamatório de linfócitos, neutrófilos e células plasmáticas com a presença de amastigotas de *L. infantum*. A confirmação é efectuada por meio imuno-histoquímico (Moraitou *et al.*, 2007).

Pode ainda ser observada colite crónica (achado incomum) e melena, devido às ulcerações na mucosa gástrica intestinal. As inflamações do trato intestinal podem abranger a mucosa e porção muscular da submucosa (Silva, 2007).

Ao nível do fígado, primeiramente a hepatomegália congestiva, devido à estase centrolobular, confere ao órgão aspecto de noz-moscada. Seguidamente, as células de Kupffer (células-alvo para *Leishmania*) por permanecerem ou passarem no órgão originam lesões granulomatosas (Melo *et al.*, 2008).

As alterações vasculares e lesões endoteliais provocadas iniciam processos de sobrecarga de amiloidose e glicogénio, induzindo processos degenerativos. Os fenómenos de necrose celular (hepatite necrótica centrolobular) acabam por dar lugar à formação de tecido fibroso (hepatite crónica) e por vezes cirrose (Ikeda-Garcia *et al.*, 2007; Correia & Alexandra-Pires, 2008).

7.5. Sistema ocular

As lesões oculares e peri-oculares de leishmaniose são muito importantes, quer pela sua gravidade, quer pela sua frequência, pois cerca de 30% dos cães apresenta lesões desde o início da doença e 15% apresenta lesões oculares como único sinal clínico (Correia & Alexandra-Pires, 2008).

As manifestações oculares mais comuns são a conjuntivite (24%-32.5%), a blefarite exfoliativa ou ulcerativa (12%), a queratite (7.5%), a queratoconjutivite seca (Fig. 18) (2.6%- 26.8%) e a uveíte (1.3% a 8.2%) (Komnenou & Koutina, 2007).

Em consequência da hipertensão arterial sistémica, pode ocorrer deslocamento da retina e/ou hemorragias, conforme observado em 5.7% dos cães hipertensos com LCan. Um estudo com 60 cães com leishmaniose revelou uma reacção inflamatória granulomatosa linfoplasmática, juntamente com a presença do parasita em 56, 2% dos tecidos oculares, maioritariamente na conjuntiva e corpo ciliar (Solano-Gallego *et al.*, 2009).



Fig18: Queratoconjutivite seca e blefarite esfoliativa peri-ocular

7.6. Sistema cardiorrespiratório

Os pulmões podem apresentar inflamação e alterações vasculares que se traduzem clinicamente por dispneia e hemoptise. No exame histopatológico podemos observar congestão, hemólise intravascular e lesões de pneumonia do tipo exsudativo e intersticial (Correia & Alexandra-Pires, 2008).

O coração pode apresentar miocardite multifocal acompanhada por necrose e degeneração das fibras do miocárdio (Silva, 2007).

7.8. Sistema músculoesquelético

O envolvimento osteoarticular é descrito em cães com LCan, que apresentam tumefacção/edema nessas articulações e dor durante a locomoção, ocasionando claudicação. Podem observar-se lesões osteoproliferativas e de osteólise no perióstio e na região intramedular (Fig. 19). Geralmente, apresentam-se afectadas várias articulações e ossos (poliartrite).

Um estudo envolvendo 58 cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* evidenciou alterações radiográficas nos ossos longos em 44,8% (Souza *et al.*, 2005).

A nível muscular surge uma atrofia generalizada na sequência de processos auto-imunes, observando-se emagrecimento, caquexia e demarcação acentuada das saliências ósseas (Fig. 20). A atrofia marcada dos músculos (amiotrofia) temporais e masséteres, associada à perda de pêlo, originou a denominação “cabeça de velha” ou fácies senil - Fig. 21, (Correia & Alexandra-Pires, 2008).



Fig. 19: Radiografia dorso-ventral da pélvis sugere osteólise e reacção osteoproliferativa no grande trocanter do fémur esquerdo



Fig. 20: Caquexia e anorexia

Para além dos sinais clínicos apresentados, os canídeos podem apresentar um conjunto de outros sinais e lesões menos comuns.

Alterações neurológicas como: letargia; convulsões; mioclonias; nistagmos; tremores; paralisia da mandíbula; meningite e rigidez cervical (Silva, 2007).

Lesões na cavidade oral e língua (Fig. 22) hiperviscosidade do soro, tromboembolismo, hemorragias e epistáxis (Manzillo *et al.*, 2009).

Doenças oportunistas e concomitantes desencadeadas pela desordem imunológica como: cistites; pneumonias bacterianas; piodermites; dermatofitoses; demodécicose; babesiose e dirofilariose (Silva, 2007).

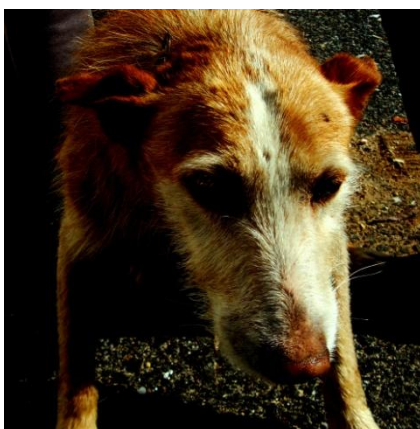


Fig. 21: Fácies senil

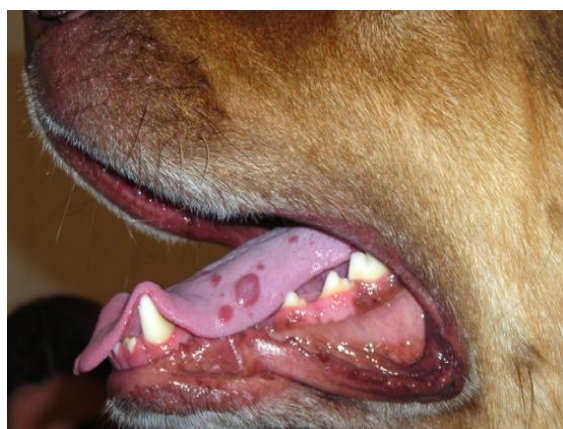


Fig. 22: Lesões nodulares na face dorsal e lateral da língua (Manzillo *et al.*, 2009)

8. Diagnóstico

A inespecificidade dos sinais clínicos torna necessário confirmar a suspeita da doença, eliminando o diagnóstico diferencial. O diagnóstico de leishmaniose canina envolve uma abordagem integrada, composta por anamnese, exame físico, análises hematológicas, bioquímicas e diagnóstico laboratorial específico (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

8.1. Alterações hematológicas e bioquímicas

As análises laboratoriais devem incluir perfil hepático e renal, para avaliar a funcionalidade do fígado e rim. Deve efectuar-se hemograma, urianálise, perfil de coagulação e proteinograma, servindo não só como apoio ao diagnóstico, mas também como ferramenta importante na decisão de eventual tratamento do animal (Dias *et al.*, 2008).

As alterações mais comuns do hemograma reportam-se à anemia (geralmente normocítica normocrómica presente em 27% dos casos) e leucopénia em 43% dos canídeos com leishmaniose (Melo *et al.*, 2008). A leucopénia (diminuição das populações de monócitos, de eosinófilos e sobretudo de linfócitos) é essencialmente devida à disfunção da medula óssea, com diminuição da hematopoiese devido ao parasitismo intenso e sequestro de leucócitos em vários tecidos e órgãos.

A alteração bioquímica mais frequente é a disproteinémia, revelando a electroforese de proteínas séricas uma hiperproteinémia com hiperglobulinémia e hipoalbuminémia, resultando em 76% dos casos diminuição do rácio albumina/globulina (Doctoral & Simó, 2009).

A hiperglobulinémia é devida a um aumento das β e γ globulinas em 71% dos casos e parece estar relacionada com a estimulação policlonal dos linfócitos B mediada pelos antígenos de *Leishmania infantum*, síntese de anticorpos não específicos e à presença de imunocomplexos circulantes.

A proteinúria e azotémia (ureia e creatinina elevada) provocadas por IRC estão presentes em cerca de 70% dos cães com sinais clínicos. No entanto, estes parâmetros indicam falha renal apenas quando a maioria dos nefrónios são disfuncionais. Assim acontece também com o aumento dos níveis plasmáticos do ião fosfato. (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Pode existir alteração das enzimas hepáticas aspartato amino transferase (AST) em 31% e alanina amino transferase (ALT) em 16% dos cães com sinais clínicos.

A trombocitopénia pode estar presente em 48% dos canídeos com leishmaniose (Doctoral & Simó, 2009).

8.2. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial é imprescindível e pode ser efectuado com base em métodos directos, indirectos e por avaliação da resposta imunitária celular (Maia & Campino, 2008).

Os métodos utilizados variam quanto à sensibilidade e especificidade, custo e facilidades de execução. Tendo em conta que cada um apresenta vantagens e desvantagens, devem ser seleccionados em função dos objectivos requeridos (Correia & Alexandra-Pires, 2008).

Até ao momento, não existe um método de diagnóstico com 100% de sensibilidade e especificidade. Recomenda-se a associação de vários métodos de modo a minimizar resultados falsos positivos e falsos negativos (Moreira *et al.*, 2007). A Fig. 23 indica os passos a seguir no estabelecimento do diagnóstico de LCan.

O diagnóstico tem como finalidade detectar a infecção por *Leishmania* num animal sintomático ou assintomático, sendo realizado essencialmente para confirmar a doença de um animal suspeito, para efectuar estudos epidemiológicos ou ainda para testar a inocuidade do sangue de um animal em processos de transfusão sanguínea. (Miró *et al.*, 2008)

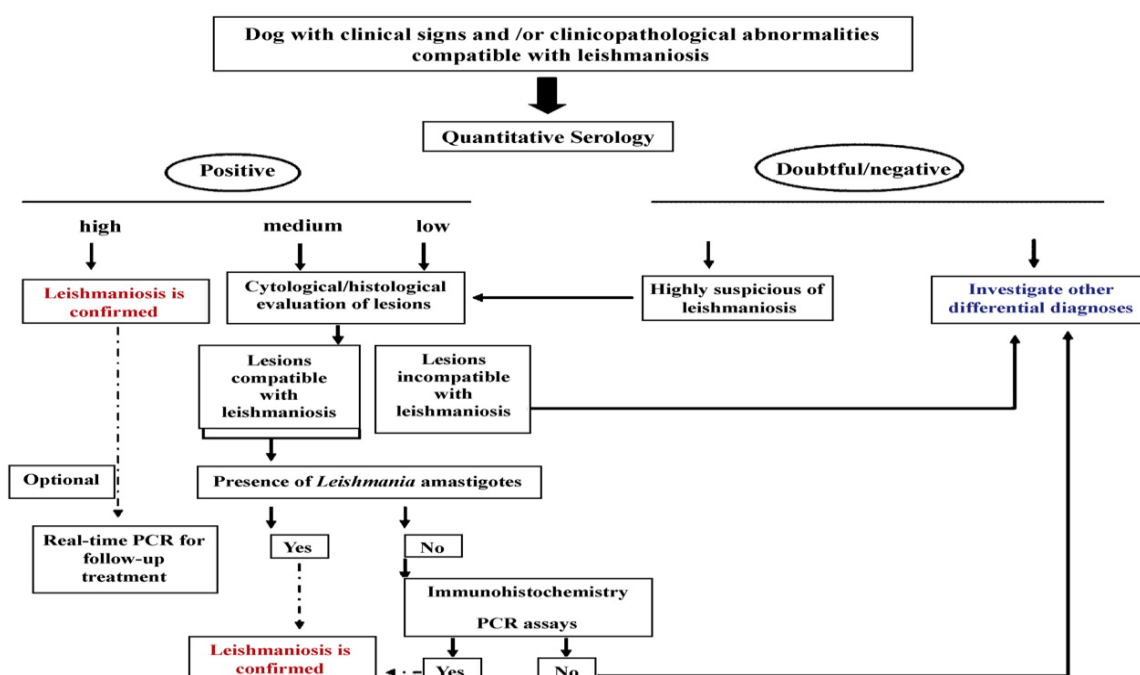


Fig. 23: Esquema a seguir no diagnóstico de LCan (Solano-Gallego *et al.*, 2009)

8.2.1. Método directo

8.2.1.1. Exame microscópico

A observação microscópica de formas amastigotas de *leishmania* spp. pode ser efectuada a partir de esfregaços obtidos por punção de nódulos, linfonodos, medula óssea e também do produto da raspagem de lesões cutâneas. Os esfregaços a partir de matriz ungueal, baço e fígado caíram em desuso por utilizarem técnicas demasiado traumáticas ou por não serem isentas de risco de hemorragia interna.

A observação directa do parasita é indiscutivelmente confirmatória da existência de infecção por *Leishmania*, mas a sua sensibilidade é fraca: cerca de 60-75% para a medula óssea e 30%-50% para o linfonodo (Maia & Campino, 2008). Contudo, demonstrou-se que o material biológico proveniente de vários tecidos melhora a sensibilidade para valores entre 71% e 91% (Laurenti, 2009).

Está demonstrado que, em cães assintomáticos, as amostras obtidas através de punção de medula óssea e linfonodos não apresentam grande utilidade na detecção do parasita implicando sensibilidades abaixo dos 30% (Saridomichelakis *et al.*, 2005).

As formas usuais de coloração destes esfregaços são Giemsa, Leishman ou Diff-Quick.

No Diff-Quick o citoplasma aparece corado de azul pálido, o núcleo de vermelho e o cinetoplasto de vermelho ou violeta, podendo os amastigotas ser encontrados livres ou no meio intracelular dos monócitos, macrófagos e neutrófilos.

A densidade parasitária no esfregaço pode ser estimada pela contagem do número de amastigotas em relação ao número de células brancas do sangue, utilizando uma escala logarítmica de 0 (sem parasitas) a 6 (superior a 100 parasitas por campo óptico). Visto que o número de organismos é variável na amostra, quantos mais campos ópticos forem analisados maior a sensibilidade do método (Saridomichelakis *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Cenini, (1989) desenvolveu uma técnica que possibilita efectuar contagem diferencial entre formas mortas e vivas de amastigotas, depois de uma coloração com diacetato de fluoresceína e brometo de etídio sob luz azul. Os parasitas vivos aparecem com uma tonalidade verde fluorescente e os mortos com coloração laranja. Esta técnica é bastante útil para efectuar o acompanhamento no tratamento de animais, requerendo contudo um microscópio de fluorescência, que tem elevados custos (Maia & Campino, 2008).

8.2.1.2. Exame histopatológico

A análise histopatológica requer realização de biópsias de pele ou de outros órgãos infectados. O processamento decorre pelas técnicas usuais de microscopia (peças fixas em formol a 10%, passando por uma inclusão de parafina) após o qual, as lâminas são observadas com uma ampliação de 1000x em óleo de imersão (Costa *et al.*, 2008). A coloração é efectuada com hematoxilina e eosina, para evidenciar o parasita nos tecidos (Gomes *et al.*, 2008). Esta técnica

é reconhecida, apesar da sua baixa sensibilidade (32% para biópsia de pele), a menos que se utilizem técnicas imunohistoquímicas (Moreira *et al.*, 2007).

Através de análise histopatológica ao intestino grosso, consegue obter-se o diagnóstico de leishmaniose com ou sem sintomatologia, não apenas em cães mas também em humanos (Moraitou *et al.*, 2007).

8.2.1.3. Imunohistoquímica

Quando a carga parasitária nos órgãos é baixa, tornando o diagnóstico difícil e duvidoso, existem técnicas mais sensíveis, como a imunoperoxidase (Fig. 24A; Fig. 24B) e a imunofluorescência directa (Fig. 24C), que servem como ferramenta complementar no diagnóstico, pois clarificam os parasitas. Estas técnicas devem ser utilizadas quando o padrão histológico indica claramente a ocorrência de doença sem observação do parasita. Os tecidos utilizados são a pele, fígado e os linfonodos (Ln) parotídeos, cervicais, mandibulares e poplíteos (Maia & Campino, 2008).

Moreira *et al.* (2007) obtiveram, através da técnica de imunofluorescência directa com amostras do Ln poplíteo, uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 92,68% em animais sintomáticos, 60% em oligossintomáticos e 73,91% em assintomáticos. Contudo, estes métodos podem determinar resultados falsos negativos, pois a sua sensibilidade depende da carga parasitária ou falsos positivos devido aos artefactos que, erroneamente, possam ser considerados amastigotas.

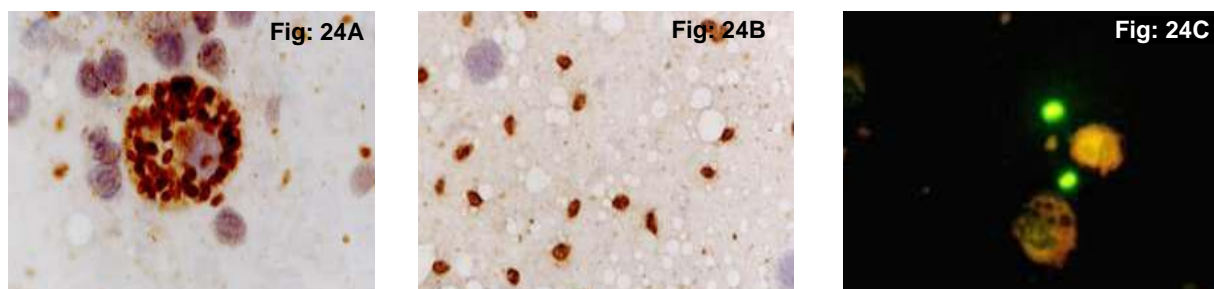


Fig. 24: Formas amastigotas de *Leishmania* intracelulares **(A)** e extracelulares **(B)** evidenciadas através da técnica de imunoperoxidase.

Reacção de imunofluorescência directa positiva **(C)** de formas amastigotas do parasita (Laurenti, 2009)

8.2.1.4. Cultura

Num estudo experimental concluiu-se que os linfonodos, baço e medula são os materiais biológicos que permitem obter maior sensibilidade quando se realiza meio de cultura (agar-sangue ou meio de infusão cérebro-coração). As formas amastigotas do parasita presentes no material biológico transformam-se em promastigotas, podendo ser observadas através de microscopia de contraste a partir da primeira semana (OIE, 2008).

Segundo Maia *et al.* 2009, há necessidade de reforçar a cultura pelo menos uma vez por semana, no total de três semanas, e apenas se considera resultado final negativo após 4 sub-culturas consecutivas negativas.

Apesar de 100% específicas, as culturas são pouco utilizadas porque implicam procedimentos invasivos na colecta do material biológico, são morosas, têm susceptibilidade à contaminação microbiológica e dependem da carga parasitária. O seu uso é profícuo em estudos experimentais como a identificação isoenzimática e modelos de infecção experimental.

8.2.1.5. Isolamento do parasita em animais de laboratório

A presença do parasita pode ser demonstrada após inoculação de material infectado num hamster (*Mesocricetus auratus*). Embora não seja usual na prática clínica, o método pode ser aplicado em estudos para avaliar os potenciais riscos de disseminação/infecção (Maia & Campino, 2008).

8.2.1.6. Xenodiagnóstico

Esta técnica tem despertado grande interesse na área de epidemiologia e consiste em detectar e isolar agentes patogénicos através do seu vector natural (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Na bacia do mediterrâneo e América Latina, vários investigadores realizaram estudos para determinar a taxa de infecção dos diferentes géneros de vectores relativos ao seu espaço geográfico, concluindo que *Phlebotomus* apresenta uma taxa de infecção muito superior (21,9%-92%) à do género *Lutzomyia* (13% a 29%). Este facto deve-se provavelmente ao menor limiar de infecção do *Phlebotomus* relativamente ao *Lutzomyia*, ou à maior carga parasitária dos cães na Europa que os torna consequentemente mais infectantes, apresentando-se assintomáticos devido à sua melhor nutrição (Maia & Campino, 2008). No entanto, parece importante referir, embora não seja exposto no artigo, que o período de diapausa do díptero nos diferentes espaços geográficos estudados é diferente.

8.2.1.7. Reacção em cadeia da polimerase

Os métodos baseados em PCR são altamente fiáveis, tanto para determinar a presença e identificação do parasita, como na monitorização após tratamento. Trata-se de uma ferramenta molecular simples que tem provado ser mais sensível e específica do que os métodos convencionais de diagnóstico.

A técnica de PCR consiste na extracção do ácido desoxirribonucleico (ADN) de qualquer amostra de material biológico (Campino *et al.*, 2002), como o pulmão, baço, rins, intestino, leite, esperma, coração e vagina, seguida de ampliação de sequências alvo de material genético, utilizando “primers” (sequências oligonucleotídicas) (Maia & Campino, 2008).

Têm sido utilizadas várias sequências - alvo de ADN parasitário, no entanto o ADN cinetoplastideal (kDNA) parece ser o mais sensível (Campino *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009)

As amostras retiradas de medula óssea, linfonodos, baço ou pele têm maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico de LCan do que amostras de sangue total, buffy coat e urina. A discrepância obtida nos resultados, quando se comparam vários tipos de amostra, explica-se pela distribuição heterogênea do parasita no corpo do animal (Maia & Campino, 2008).

De acordo com Maia *et al.* (2009), Ln-PCR é útil como primeira linha de diagnóstico ou para acompanhamento terapêutico e BM-PCR para cães sem linfonodos poplíteos palpáveis.

Recentemente, a colheita de material a partir de esfregaços de conjuntiva, quer para diagnóstico quer no acompanhamento do tratamento, têm demonstrado bons resultados (Ferreira *et al.*, 2008).

É importante destacar que o resultado obtido por PCR não deve ser separado dos aspectos clínicos e avaliação serológica, devendo ter-se em conta, no sentido de fornecer uma avaliação a mais precisa possível, o conjunto de todas as informações.

Um resultado de PCR negativo não é suficiente para descartar infecção por *Leishmania*, principalmente em cães clinicamente saudáveis com destino a zonas não endémicas, nos dadores de sangue para processos de transfusão ou quando existem indícios fortes de doença (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A optimização dos resultados na técnica de PCR resulta de variados factores como a escolha dos “primers”, número de cópias alvo, método de extracção de ADN, material biológico recolhido e protocolo. (Maia & Campino, 2008).

O PCR convencional ou qualitativo é útil na presença de casos serológicos duvidosos, contudo, em cães na fase crónica ou com baixa carga parasitária após tratamento, as técnicas não quantitativas aduzem pouco valor diagnóstico, porque apenas indicam se o animal é ou não positivo. Actualmente, através da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) é possível obter valores quantificáveis, que permitem a avaliação da resposta à terapêutica (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

RT-PCR é uma técnica avançada que pode detectar cargas parasitárias extremamente baixas quando comparada com o PCR convencional. Permite, ainda, reduzir o tempo de processamento, reduzir o risco de contaminação, obter bons valores de sensibilidade e monitorizar a carga parasitária durante a terapêutica farmacológica (Maia & Campino, 2008).

8.2.2. Diagnóstico indirecto

Existem vários métodos serológicos desenvolvidos para o diagnóstico de Lcan, dos quais se destacam a imunofluorescência indirecta (IFI), a aglutinação directa (DAT), a hemaglutinação indirecta (HI), a contraímuno-electroforese (CIE), os testes de fixação de complemento e vários tipos de ensaios imuno-enzimáticos (ELISA de competição; Dot-ELISA; Slide-ELISA) (Maia & Campino, 2008). Na maioria das técnicas mencionadas podem ocorrer falsos positivos, devido à persistência de anticorpos específicos ou a reacções cruzadas com anticorpos de outros agentes patogénicos como *Erlichia canis* ou *Trypanossoma cruzi*, assim como falsos negativos quando, por exemplo, a serologia se efectua no período pré-patente da doença. Pelo exposto mais uma vez se realça a necessidade de avaliar a serologia conjuntamente com o quadro clínico.

8.2.2.1. Ensaio imuno-enzimático

ELISA tem grande utilidade tanto no diagnóstico individual como em estudos epidemiológicos. Para além de permitir processar um grande número de amostras ao mesmo tempo é executada de forma simples e rápida (Maia & Campino, 2008).

O soro constitui a principal amostra recolhida, permitindo a detecção de imunoglobulinas específicas no soro (anticorpos específicos anti-*Leishmania*). As suas concentrações podem ser relacionadas com o nível de parasitémia e o estado clínico do animal (Doctoral & Simó, 2009).

A sensibilidade e especificidade desta técnica são limitadas quando o animal não desenvolve resposta humoral (Moreno *et al.*, 1999). Um cão infectado pode desenvolver uma resposta do tipo celular e consequentemente ausência ou baixa concentração de Ac anti-*Leishmania* no soro, implicando menor sensibilidade (Doctoral & Simó, 2009; Andrade *et al.*, 2009). As quantidades de anticorpos no soro também podem estar diminuídas em estados avançados de doença em que os animais mais velhos, por falência do sistema imunitário, não produzem anticorpos. No total, estima-se que os resultados possam estar subestimados até 30% (Doctoral & Simó, 2009).

Por outro lado, a existência de anticorpos anti-*Leishmania* não implica forçosamente doença, pois cerca de 10% dos cães infectados, com um título significativo de anticorpos anti-*Leishmania*, nunca desenvolvem doença (Maia, 2005).

Apesar disso, a técnica de ELISA pode apresentar uma especificidade de 90,5% e uma sensibilidade de 100% (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

A seroconversão ocorre aproximadamente três meses após a infecção e os animais doentes desenvolvem resposta imune humoral com produção de altos títulos de IgG anti-*Leishmania*. A técnica de ELISA mostrou ser um teste serológico muito sensível na avaliação precoce de animais com infecção (Otranto *et al.*, 2009) e apenas animais com menos de 3 meses de idade

não devem ser avaliados por meio de métodos serológicos, pois podem apresentar resultados positivos pela presença de anticorpos maternos (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Estudos indicam que cães e humanos com proteinúria e glomerulonefrites podem apresentar anticorpos anti-*Leishmania* na urina, como consequência de lesão glomerular decorrente da infecção ou devido à produção de anticorpos no tracto urinário. Esta metodologia, não invasiva, tem utilidade para o diagnóstico e prognóstico de cães com afecção renal (Solano-Gallego *et al.*, 2003).

A sensibilidade e especificidade de ELISA também dependem muito do protocolo e do tipo de antígeno utilizado (Miró *et al.*, 2008). A grande variedade de antígenos existentes para a elaboração destas provas (proteínas recombinantes, extractos purificados, extractos com a totalidade do parasita, péptidos sintéticos e promastigotas solúveis) torna difícil a standardização da metodologia serológica.

As técnicas que utilizam antígenos totais são limitadas em termos de especificidade, devido ao facto de apresentarem reacções cruzadas não somente com tripanossomas, mas também com organismos filogeneticamente distantes. Como referido atrás, as reacções cruzadas com outros parasitas podem conduzir a resultados falsos positivos (Gomes *et al.*, 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Os avanços tecnológicos permitiram a clonagem molecular de vários genes que codificam proteínas antigénicas de *Leishmania* (proteínas recombinantes), obtendo diagnósticos mais específicos, como demonstra um estudo comparativo que utilizou antígenos recombinantes com epítomos específicos rK39, (especificidade, 85-100%) (Miró *et al.*, 2008). O antígeno rK39, predominante nos amastigotas é uma repetição de 39 aminoácidos da proteína cinesina LcKin, e constitui um potente imunógeno de linfócitos B. No entanto, a resposta humoral em humanos relativamente a esta proteína parece ser mais relevante do que em canídeos (Goto *et al.*, 2009).

Existe ainda a utilização, em conjunto, de diversos antígenos que parece aumentar a sensibilidade de ELISA comparativamente ao uso de apenas um antígeno. A combinação pode ser realizada em paralelo ou aplicando uma proteína químera. Embora o uso de proteínas químeras simplifiquem o diagnóstico, é possível que haja perda de alguns epítomos no processo de fusão (Dapra *et al.*, 2008; Doctoral & Simó, 2009).

A tabela 6 refere os resultados promissores, tanto no diagnóstico da leishmaniose visceral humana como na LCan, quando são utilizados antígenos recombinantes, através da técnica de ELISA.

Tabela 6: Sensibilidades e especificidades correspondentes ao uso de diferentes proteínas recombinantes para o diagnóstico de LCan, através da técnica de ELISA (Doctoral & Simó, 2009)

Antigénio	Sensibilidade	Especificidade	Antigénio	Sensibilidade	Especificidade
A2	87%	98%- 100%	Hsp70	75%-100%	ND
CPA	100%	ND	K39	97%-99%	85%-100%
CPB	76%	ND	K39; K26; A2 (em paralelo)	100%	85%
GP63	100%	ND	Ldcccys1	98%	97%
GRP94	84%	ND	LiP2A	88%	100%
H2A	72%-78%	ND	LiP2B	100%	100%
Hsp83	90%	ND	Proteína quimera (CA)	98%	99%
H3	68%-81%	100%	Proteína quimera (Leishmanchek)	82%-94%	97%
K26	92%-99%	96%-99%	Proteína quimera (K9; K26; K39)	96%	99%

8.2.2.2. Imunofluorescência indirecta

A imunofluorescência indirecta (IFAT) utiliza o corpo inteiro do parasita (forma promastigota) como antigénio. A amostra é considerada positiva quando proporciona uma fluorescência verde e negativa quando a coloração é vermelho opaco (Maia & Campino, 2008)

Maia *et al.* 2007, considerando no seu estudo cães sintomáticos e assintomáticos em áreas endémicas, obteve uma sensibilidade de 85,5% e especificidade de 94,7%. Como desvantagens, a aplicação desta técnica exige um elevado nível de experiência e equipamento dispendioso.

8.2.2.3. Ensaio de imunodifusão

Esta técnica foi desenvolvida por Bernadina, (1997) para diagnóstico de LCan e consiste na imunodifusão dupla em gel agarose.

Há formação de bandas após 1 dia, ao qual se segue coloração. Este ensaio é fácil de executar e não exige equipamentos sofisticados. Apresenta uma sensibilidade de 69% em cães assintomáticos e 100% em cães sintomáticos (Maia & Campino, 2008).

8.2.2.4. Teste de aglutinação directa

Actualmente, estão disponíveis testes que apenas demoram 3 horas a obter resultados, baseados na técnica de DAT, existindo uma concordância de 81,25% entre os testes de DAT e IFAT. Uma das limitações do DAT é o tempo de incubação relativamente longo (18 h) e as

diluições necessárias da amostra. Não obstante, é barato, simples de executar e o desenvolvimento do antígeno liofilizado permite o seu uso em condições de campo a altas temperaturas (Maia & Campino, 2008).

8.2.2.5. “Kits” rápidos

Em Portugal, existem alguns testes rápidos (WITNESS *Leishmania*® e o Speed Duo Leish/Ehrli®) baseados no método de imunocromatografia de membrana para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*, através de um antígeno purificado do género *Leishmania*. Para realizar estes testes utilizam-se amostras de sangue total, soro ou plasma. Contudo, apesar da sua atractividade por apresentarem resultados imediatos, oferecem uma especificidade baixa (60%-71%) (Silva, 2009).

8.2.2.6. Métodos imunológicos com aplicações experimentais.

Existem outros testes não aplicáveis ao diagnóstico de rotina, uma vez que, para além de serem dispendiosos, demorados e complexos, requerem conhecimento técnico aprofundado, sendo limitados essencialmente a trabalhos de investigação. Destaca-se o uso dos testes de classificação de partículas microscópicas suspensas num fluxo de fluidos (Citometria de fluxo), e o Western blotting quantitativo computadorizado (Maia & Campino, 2008).

8.2.3. Imunidade celular

Determinar com precisão a resposta celular específica à *Leishmania* é um indicador crucial de sobrevivência do hospedeiro (Maia & Campino, 2008).

8.2.3.1. Reacção de Montenegro

A reacção de Montenegro consiste na medição do diâmetro de induração e eritema, 72 horas após a inoculação intradérmica do antígeno de *Leishmania*. Resultados negativos indicam ausência de contacto com o parasita, ou imunossupressão.

Através deste método foi diagnosticado em Portugal, numa zona endémica, um maior número de cães infectados, comparativamente com outras técnicas de diagnóstico. Os resultados podem ser positivos mesmo quando apenas existe infecção sub-clínica, após tratamento ou mesmo num estágio inicial de doença (Maia & Campino, 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

8.2.3.2. Teste intradérmico

Os testes dérmicos (*Leishmania skin test* – LST) são utilizados para avaliar a resposta de hipersensibilidade em humanos relativamente à leishmaniose. Embora haja pouca informação

em relação à sua aplicabilidade em cães (Solano-Gallego *et al.*, 2005), sendo considerado pela OIE (*The World Organization for Animal Health*) sem qualquer valor para o diagnóstico da leishmaniose canina (OIE, 2004) tem sido útil em algumas áreas de investigação, como demonstrado num estudo comparativo de imunidade celular e imunidade humoral, realizado em Palma de Maiorca (Solano-gallego *et al.*, 2005).

9. Tratamento

O tratamento da leishmaniose canina é um tema controverso e polémico, pois evidencia-se um conjunto de considerações discutíveis relacionadas com a saúde pública.

Admitindo que um cão infectado não tem cura e visto que é o principal reservatório da doença para a espécie humana, existe necessidade de um controlo sanitário e uma vigilância veterinária especial (Meireles, 2008).

Em geral, os tratamentos existentes conseguem diminuir a carga parasitária e a sintomatologia associada, mas não a eliminação total do parasita. O canídeo pode ficar curado clinicamente durante 6 meses a um ano, mas continua portador de *Leishmania*, notificando-se cerca de 80% de recidivas após um ano (Moreno & Alvar, 2002). A actividade infectante para flebótomos aumenta 3 a 5 meses após o último tratamento.

Estas recidivas podem ser justificadas pela localização intracelular do parasita (Barrientos *et al.*, sd), pela existência de resistências ao tratamento, pela resposta imunitária apenas parcialmente eficaz, pelas diferenças fisiológicas e farmacocinéticas, assim como devido a factores nutricionais, predisposição genética e diferentes concentrações parasitárias nos tecidos.

Este conjunto de factores implica a repetição de ciclos de tratamento pelo menos uma vez por ano. Todavia, um tratamento só é eticamente aceitável quando previamente se efectuou um diagnóstico precoce da doença, se analisou pormenorizadamente o estado clínico do animal e se escolheu uma terapêutica etiológica e sintomática apropriada ao caso clínico.

Os proprietários deverão ser responsabilizados nas várias decisões, sempre devidamente elucidados pelo Médico Veterinário acerca do prognóstico da doença, custos, duração dos tratamentos e das implicações da doença em termos de saúde pública.

Em suma, perante um cão com leishmaniose, só existem duas alternativas: proceder à eutanásia ou instituir uma terapêutica e vigilância veterinária continuada (Meireles, 2008).

Quando se opta pela terapêutica, cujo objectivo é o tratamento etiológico e sintomático, podemos referir fármacos leishmanioestáticos, moduladores do sistema imunitário (imunossuppressores e imunoestimulantes) e ainda fármacos destinados ao controlo de complicações secundárias (Meireles, 2008).

Uma vez instituída a terapêutica, torna-se necessário monitorizar a resposta à mesma, avaliando o estado clínico, efectuando análises serológicas hematológicas e bioquímicas a cada 3 a 6 meses e por fim, se possível, proteinograma e RT-PCR (Petersen, 2009).

As drogas licenciadas na Europa específicas para o tratamento de LCan são o antimoniato de glucamina, aminosidina e miltefosina.

9.1. Compostos antimoniais

As formas pentavalentes como o antimoniato de N. metil glucamina ou antimoniato de glucamina (Glucantime®) são mais utilizadas nas zonas latinas e francófonas, sendo o Estibogluconato de sódio (Pentostan®) mais utilizado em países anglo-saxónicos (Meireles, 2008).

O seu mecanismo de acção não está completamente esclarecido, contudo, pensa-se que actuam sobre o mecanismo energético do parasita diminuindo a viabilidade dos microrganismos expostos, bloqueando a formação de adenosina trifosfato (ATP) através da inibição dos enzimas fosfofrutoquinase e piruvatodesidrogenase (Barrientos *et al.*, sd).

Em relação à farmacocinética dos antimoniais, sabe-se que existe uma variação significativa em relação ao aumento do tempo de semi-vida do fármaco em cães com insuficiência renal, como demonstrado em experiências com hamsters (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Estudos comprovam que estes compostos são eliminados rapidamente por via renal (80% em 9 horas), e que os níveis plasmáticos não mantêm a concentração inibitória desejada, após 12 horas da sua administração, pelo que se recomenda uma segunda dose diária (Barrientos *et al.*, sd).

A dose recomendada de antimoniato de N. metil glucamina, pelo fabricante do glucantime®, é de 100 mg/kg/dia, via S.C ou I.M, durante um período mínimo de 3 a 4 semanas, advertindo ser prudente diminuir as doses no começo do tratamento se a função renal estiver comprometida (Apifarma, 2007). Contudo, existem autores que duplicam e triplicam a dose, com administrações em dias alternados, afirmando que a toxicidade é semelhante à verificada com 100 mg/kg/dia.

Segundo vários autores, a via subcutânea é a recomendada, pois evita reacções locais é menos dolorosa e aumenta a permanência do fármaco no organismo relativamente às outras vias.

Alguns autores recomendam 2 a 3 séries de administrações diárias, durante 20 a 30 dias consecutivos ou em dias alternados, com um intervalo em cada série de 15 dias a um mês. No entanto, evidenciam-se melhores resultados quando o tratamento se prolonga até aos 45 dias.

Embora os antimoniais sejam pouco nefrotóxicos, a maior parte dos cães com LCan apresenta lesões renais antes da instituição da terapêutica, o que poderá ser confundido com os efeitos secundários de Glucantime® (Meireles, 2008) .

A combinação de antimoniato de N. metil glucamina com alopurinol é considerada a terapia mais eficaz e constitui a primeira linha de protocolo contra a doença. Contudo diversos protocolos terapêuticos são sugeridos no que concerne à dosagem, intervalo da dose e duração do tratamento (Solano-Gallego *et al.*, 2009). As doses inapropriadas deste medicamento têm contribuído para o aparecimento de resistências tanto em humanos como em cães.

A combinação de antimoniato (100 mg/kg/dia, via SC) até à resolução dos sinais clínicos e alopurinol (20 mg/kg /BID, via PO) durante 9 meses, têm evidenciado bons resultados (Ciaramella & Corona, 2003b).

Como efeitos secundários o animal pode apresentar mialgia, vômitos, diarreias, dor abdominal, apatia, alterações hepáticas, renais e pancreáticas, pelo que é aconselhável começar a medicação com doses inferiores às terapêuticas, para testar possíveis reacções adversas. Sabe-se ainda que o risco de toxicidade é potenciado em cães com taxa de filtração glomerular reduzida (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Relativamente ao estibogluconato de sódio (Pentostan®), a dose recomendada é de 10-20 mg/kg, via IM, com séries de administrações semelhantes ao glucantime®.

9.2. Análogos das purinas

O alopurinol é um análogo estrutural da hipoxantina que depois de metabolizado por *Leishmania*, é incorporado no seu RNA restringindo a síntese proteica, actuando como um leishmanioestático. É também usado no tratamento da gota em humanos (Meireles, 2008).

As doses usadas variam de 10 mg a 20 mg/kg/dia, via oral, geralmente repartida em duas ou três tomas por dia durante 2 a 3 meses, podendo prolongar-se entre 6 meses a 18 meses. Alguns autores recomendam o seu uso para o resto da vida (Barrientos *et al.*, sd).

O principal objectivo do uso de alopurinol em associação com antimoniais reside principalmente na prevenção de recidivas, diminuição do tempo e dos custos de terapia com antimoniais, aumentando a tolerância à terapia.

A baixa toxicidade, juntamente com a forma de administração tornam este medicamento um dos favoritos na escolha do tratamento (Baneth, 2002). Como efeitos secundários podem surgir náuseas, vômitos, elevação de enzimas hepáticas AST e ALT e presença de cálculos de xantina na urina principalmente em cães com insuficiência hepática (Doctoral & Simó, 2009).

9.3. Miltefosina

A miltefosina é um fosfolípido com uma estrutura semelhante aos compostos metabolizados por *Leishmania* e actua de forma a inibir a síntese da membrana celular do parasita. Tem actividade contra as formas promastigotas extracelulares e destrói as formas amastigotas. O Milteforan®, recentemente comercializado em Portugal, recomenda uma dose de 2 mg/kg/dia,

via oral, durante 28 dias. A sua principal vantagem é não ser eliminado pelas vias renais, podendo assim ser indicado para cães com insuficiência renal (Meireles, 2008). Vários autores indicam uma efectividade semelhante à registada por compostos antimoniais, mas com a vantagem de ser administrada oralmente e não apresentar toxicidade renal e hepática. Deve ser combinado como o alopurinol, para evitar recidivas.

Como efeitos secundários apresenta distúrbios gastrointestinais, principalmente vómitos (Doctoral & Simó, 2009).

9.4. Anfotericina B

Anfotericina B é um macrólido produzido por *Streptomyces nodosus* (Ciaramella & Corona, 2003b), primeiramente usado como anti-fungico, pode também ser usado no tratamento de algumas doenças provocadas por protozoários (Baneth, 2002). O seu modo de acção relaciona-se com a capacidade de se unir aos episteróis (constituente das membranas celulares de *Leishmania*), provocando perdas de aminoácidos, purinas e potássio (Doctoral & Simó, 2009).

A dose recomendada é de 0.5 a 0.8 mg/kg, IV duas a três vezes por semana, num total cumulativo de 8 a 15 mg/kg. Afigura-se essencial a monitorização da função renal durante e após o tratamento, devido à acção nefrotóxica desta droga.

O uso de formulações melhoradas com emulsões lípidicas conseguiram melhorar os efeitos nefrotóxicos e diminuir as doses aplicadas, mas a sua aplicação é limitada pelo seu elevado custo e pelas dificuldades inerentes à via de administração intravenosa. Não obstante, a anfotericina B Lipossomal (L-AmB) é uma frequente escolha em casos de infecção humana (anexo 1), estabelecendo a cura em 95,7% de crianças tratadas, com uma dose total de 18 mg/Kg (Cascio *et al.*, 2004).

Os lipossomas funcionam como vectores de medicamentos, cuja função é transportar determinados fármacos até ao local da infecção. No caso de *Leishmania*, os vectores têm que se fundir com o fagolisossoma, para que o medicamento exerça o seu efeito. Devem ainda ser pequenos, para que possam atravessar os vasos sanguíneos e atingir as zonas inflamadas (Meireles, 2008).

Os melhores resultados clínicos registados em LCan foram obtidos com administrações nos dias 1,2,3,4 e 10, com a dose de 3 mg/Kg, via IV.

Como efeitos secundários indesejáveis podemos referir flebite, anorexia, vómitos, anemia, icterícia e paragem cardíaca (Baneth, 2002).

9.5. Aminosidina

Aminosidina é um antibiótico aminoglicósido que actua inibindo a síntese proteica de *Leishmania*, é muitas vezes associado aos compostos antimoniais, potenciando a sua persistência ao nível do sangue.

A dose recomendada é de 5.25 mg/kg/BID por via intramuscular ou subcutânea, durante 3 semanas. Alguns autores recomendam uma dose de 20 a 80 mg/kg por dia.

Apresenta como possíveis efeitos indesejáveis ototoxicidade e nefrotoxicidade, sendo contra indicado em canídeos com nefropatia (Ciaramella & Corona, 2003b).

9.6. Pentamidina

Derivado aromático de diamidina, actualmente pouco utilizado. A sua actividade está relacionada com a desorganização do metabolismo do ácido nucléico e alteração das membranas internas do mitocôndria (Simon et al., 2006).

A dose usualmente utilizada de pentamidina é 4 mg/kg de peso vivo, por via IM, em dias alternados durante 4 semanas. Apresenta no entanto toxicidade superior e uma eficácia inferior quando comparada com os antimoniais, pode causar nefrite, hepatite, dor abdominal, vômitos, hipotensão, síncope e abscessos musculares (Baneth, 2002).

9.7. Derivados do Imidazol

Os imidazóis (metronidazol, ketoconazol, itraconazol e secnidazol) são antifúngicos que têm afinidade pelos esteróis das membranas celulares de *Leishmania* inibindo a sua síntese, provocando desta forma a depleção das reservas glucogénicas e a sua morte. Por outro lado, formam complexos com o ADN parasitário, inibindo a síntese dos ácidos nucleicos.

As doses a aplicar são respectivamente: Metronidazol, 10 a 15 mg/kg, de 12 em 12 horas, via oral, durante 15 dias; Ketoconazol, 7 mg/kg por dia, via oral, durante 3 meses; Itraconazol, 4 mg/kg por dia, via oral, durante 6 semanas; Secnidazol, 30 mg/kg por dia, via oral, durante 15 dias (Meireles, 2008).

9.8. Fármacos Imunomoduladores

Os imunomoduladores (imunossupressores ou imunoestimulantes) podem ser usados na sequência das alterações imunológicas decorrentes da doença.

A prednisona, prednisolona, 1 a 2 mg/Kg, via oral são as drogas imunossupressoras frequentemente usadas em associação com a terapia anti-*Leishmania* (Ciaramella & Corona, 2003b). Deprimem a imunidade humoral e consequentemente a formação de imunocomplexos. No entanto, por deprimirem também a imunidade celular, apenas são recomendadas se ocorrerem processos concomitantes com deposição de imunocomplexos, como disfunção renal, leões oculares graves ou epistaxis (Adamama-Moraitou et al., 2005).

A utilização de imunoestimulantes como o levamizol e citoquinas tem como objectivo fundamental estimular a imunidade celular e activar os macrófagos (Barrientos et al., sd).

Levamisol é um antihelmíntico, a dose recomendada é de 0,5 a 2 mg/kg, em dias alternados, por um período que poderá ir até aos dois meses.

As citocinas recombinantes como as interleuquinas (interferão- gama) têm sido usadas em estudos experimentais e científicos, principalmente em humanos. A sua utilização, em cães, ainda é muito limitada (Meireles, 2008).

9.9. Tratamento sintomático

Juntamente com a terapêutica leishmanicida ou leishmanostática, é necessário efectuar uma terapêutica sintomática de acordo com o caso clínico apresentado (Barrientos *et al.*, sd). Podemos instituir antibioterapia de largo espectro de acção, fluidoterapia, dietas hipoproteicas, transfusões de sangue, hepatoprotectores e terapêutica efectiva para insuficiência renal (Meireles, 2008).

9.10. Fitoterapia e homeopatia

Estes métodos podem ser usados em opção aos fármacos convencionais ou de forma complementar a estes (Meireles, 2008).

O quassin é um produto extraído da casca de uma árvore (*Quassia amara*), e tem sido utilizado em medicina tradicional chinesa. Das suas aplicações destaca-se o papel leishmanicida. Estudos em murganhos demonstram que uma dose de 25 µg/ml promove uma resposta imune do tipo Th1 e suprime a resposta humoral, ao mesmo tempo que promove uma indução da via iNOS (Bhattacharjee *et al.*, 2009).

A homeopatia é a medicina do indivíduo, sendo a terapêutica sempre diferente, trata o doente na sua globalidade. A tabela 7 enumera algumas espécies de animais e plantas que podem fazer parte integrante de princípios medicamentosos em fitoterapia e homeopatia no tratamento de LCan (Meireles, 2008).

Tabela 7: Homeoterapia e Fitoterapia no tratamento da leishmaniose canina (adaptado de Meireles, 2008)

Fitoterapia		Homeopatia
Espécie	Espécie	Espécie
<i>Cynara scolymus</i>	<i>Peumus boldus</i>	<i>Apis mellifica</i> (abelha)
<i>Cinchona officinalis</i>	<i>Equisetum arvense</i> (cavalinha)	<i>Arsenicum álbum</i> (arsénio)
<i>Erytraea centaurium</i>	<i>Malva silvestris</i> (malva comum)	<i>Gelsemium sempervirens</i>
<i>Gentiana lutea</i>	<i>Thymus vulgaris</i> (tomilho)	<i>sulphur</i> (enxofre)
<i>Arctium lappa</i>	<i>Peumus boldus</i>	<i>Thuya occidentalis</i> (cedro da paz)

10. Vacinas

Centros de pesquisa especializados, localizados principalmente em zonas endémicas, têm vindo a realizar trabalhos no sentido de desenvolver uma vacina eficaz no combate à Lcan (Reis *et al.*, 2010). Esta constituiria decerto a melhor medida para prevenir a doença na população canina e diminuir a infecção nos humanos (Miró *et al.*, 2008).

A existência de canídeos que desenvolvem resposta protectora natural contra o parasita indica que é possível estimular uma resposta imunitária eficaz mediante vacinação (Doctoral & Simó, 2009).

Os modelos experimentais com hamsters são os mais utilizados, sobretudo nas primeiras fases de ensaios de vacinas, dado o paralelismo existente entre as manifestações clínicas, tanto no homem como em canídeos (Doctoral & Simó, 2009).

Idealmente, uma vacina eficaz contra *Leishmania* deveria promover uma resposta imunitária protectora de longa duração, estimular uma resposta do tipo Th1 com activação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicos, produção de IFN- γ , indução da via do ON nos macrófagos, protecção cruzada contra as diferentes espécies de *Leishmania*, ser estável e ser comercializada a custo acessível para todas as zonas afectadas, constituídas maioritariamente por países em vias de desenvolvimento (Palatnik-de-Sousa, 2008).

O último requisito descrito torna-se seguramente o motivo pelo qual a indústria do medicamento não tem demonstrado sério interesse em investir nesta doença (Sima-Rafati *et al.*, 2006). Contudo, os avanços dos últimos anos permitiram o licenciamento de duas vacinas no Brasil: Leishmune® (Fort Dodge Animal Health) e Leishtec® (Hertape Calier Animal Health). Outras vacinas contra a infecção de *Leishmania infantum* encontram-se em fase experimental, incluindo vacinas de primeira, segunda e terceira geração (Dantas-Torres, 2009). Em Portugal agenda-se em Junho de 2011 o lançamento de uma vacina.

Segundo as recomendações da OMS, para que uma vacina possa ser comercializada deve passar com sucesso numa série de fases durante as fases experimentais.

A fase I tem como propósito comparar os vacinados e os animais sujeitos a placebo avaliando a imunogenicidade e segurança vacinal. Na segunda fase, é confirmada a protecção induzida pela vacina nos modelos experimentais. Na fase III procede-se à análise da eficácia vacinal contra a infecção natural, numa população reduzida de indivíduos. Caso a vacina ultrapasse com sucesso estas etapas, poderá então ser registada e industrializada transitando para a fase IV, onde é alargada à população no geral (Palatnik-de-Sousa, 2008).

A escolha do antigénio é a base do sucesso para conceber uma vacina eficaz (Miró *et al.*, 2008), assim como a escolha do adjuvante, uma vez que pode potenciar a imunogenicidade dos antigénios utilizados e reduzir a dose necessária de vacina (Reis *et al.*, 2010).

A utilização de biomarcadores confiáveis e mensuráveis para determinar o grau de imunogenicidade e protecção induzida pelas vacinas contra a leishmaniose canina é

fundamental para obter evidências sobre a eficácia da vacina na sua posterior comercialização (Reis *et al.*, 2010).

As vacinas podem ser divididas em três categorias: de 1ª geração, compreendem as vacinas vivas, as atenuadas e as inactivadas; de 2ª geração, englobam as vacinas de fracções purificadas e de proteínas recombinantes; e de 3ª geração que abarcam vacinas genéticas, originadas a partir do ADN de antigénios (Doctoral & Simó, 2009).

10.1. Vacinas de 1ª geração

10.1.1. Vacinas vivas

Baseiam-se na indução de imunização a partir da inoculação de organismos vivos, retirados de lesões activas de leishmaniose cutânea. O seu uso delimitava-se aos países Asiáticos e Africanos, apesar de se utilizarem ainda no Uzbequistão (Doctoral & Simó, 2009).

10.1.2. Vacinas vivas atenuadas

Têm a vantagem de simular uma infecção natural, contudo sendo avirulenta permite exposição a grande número de antigénios durante um longo período de tempo, facilitando a estimulação da resposta imunitária. Como desvantagem releva-se o risco potencial devido à ocorrência de mutações e reversibilidade da virulência (Doctoral & Simó, 2009).

10.1.3. Vacinas inactivadas

A maior parte das vacinas inactivadas basearam-se em ensaios contra a leishmaniose cutânea. Na América a maioria destas vacinas utilizava o antigénio autoclavado de *L. amazonensis* (ALA) ou uma mistura de espécies autóctones, enquanto no Velho Mundo era usado antigénio autoclavado de *L. major* (ALM). A autoclavagem da vacina do parasita inactivo foi introduzida como a melhor forma de esterilização e preservação de vacinas em países com indústria biotecnológica rudimentar, onde não era viável uma distribuição refrigerada da vacina (Palatnik-de-Sousa, 2008). Embora os resultados obtidos indiquem que são seguras e imunogénicas, não se obtém boa protecção, permanecendo a maior parte das vacinas na fase II e III em cães e humanos. O valor médio da eficácia (E.V) destas vacinas é baixo (54,38%) (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Vários autores afirmam que estas vacinas não devem ser utilizadas como monoterapia, mas sim combinadas com a quimioterapia usual (tratamento antimonial), com vista a reduzir o seu efeito tóxico e doloroso. Têm sido utilizadas como imunoterapia contra a leishmaniose cutânea em humanos no Brasil e Venezuela, onde de resto, foram registadas como auxiliares terapêuticos (Palatnik-de-Sousa, 2008).

10.2. Vacinas de 2ª geração

10.2.1. Vacinas de fracções purificadas

Este tipo de vacinas consiste na imunização do animal com determinadas fracções do parasita purificado a partir de culturas de parasitas inteiros. Este tipo de vacinas é o registado e comercializado no Brasil (Leishmune®) e baseia-se na imunização mediante um antigénio purificado FML (ligando fructose-manose) da espécie *L. donovani* (Nogueira *et al.*, 2005).

Os adjuvantes utilizados com este antigénio são o BCG (bacillus of Calmett and Guérin), IL-12, saponina e Quil A (Coler & Reed, 2005). Pensa-se que o principal antigénio do complexo FML é a NH36 (hidrolase nucleósida), uma enzima essencial envolvida na quebra de nucleósidos, libertando ADN livre (bases purina) que é posteriormente utilizado na síntese de ADN, permitindo a multiplicação do parasita. No entanto, alguns autores afirmam que a Gp63, uma glicoproteína presente na superfície celular das formas amastigotas e promastigotas, apresenta o papel primordial como antigénio do complexo MFL (Dunning *et al.*, 2009).

Ensaio da fase III demonstram que a vacina é segura, imunogénica e protectora a longo prazo. Alguns autores referem o seu potencial imunoterapêutico em animais naturalmente infectados e também como vacina bloqueadora na transmissão do parasita (Doctoral & Simó, 2009), pois o aumento de anticorpos no hospedeiro previne o desenvolvimento do parasita no insecto vector, interrompendo o ciclo epidemiológico (Nogueira *et al.*, 2005). No entanto, são requeridos mais ensaios desta vacina, para ser registada e comercializada na Europa (Doctoral & Simó, 2009).

A vacina foi avaliada no Brasil e apresentou uma V.E de 80% em três estudos de campo, (Miró *et al.*, 2008) e uma protecção específica entre 92% e 95% nos ensaios clínicos com canídeos, na fase III (Nogueira *et al.*, 2005).

A vacinação reduziu a morbilidade e incidência da doença na população de canídeos, conforme asseverado pela ausência de sinais clínicos e pelos resultados negativos de PCR a amostras de sangue e linfonodos (Palatnick-de-Sousa, 2008). Este efeito durou pelo menos 3,5 anos, tendo sido concomitante com a redução da incidência da doença em humanos nessa área. Por outro lado, a manutenção das proporções normais dos níveis de linfócitos CD4⁺ e CD21 no sangue de cães vacinados indicam que a vacinação com a vacina FML reduz a actividade infectante do cão ao díptero.

A segunda vacina baseada em fracções purificadas do parasita foi estudada em França. É segura, tem boa imunogenicidade e apresenta uma protecção quase completa contra *L. infantum*. Esta vacina contém os antigénios excretados-segregados a partir de culturas de amastigotas de *Leishmania infantum* (LiESAp). No entanto, não se encontra registada devido à dificuldade em estandardizar a vacina (Miró *et al.*, 2008; Doctoral & Simó, 2009).

10.2.2. Vacinas de antígenos recombinantes

Os antígenos recombinantes de *Leishmania* constituem proteínas imunogénicas derivadas da clonagem de genes de *Leishmania* (Miró *et al.*, 2008). Estas vacinas podem ser ensaiadas sozinhas ou em combinação (poliproteínas ou quimeras) (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Apenas uma vacina de segunda geração composta pela fusão de proteínas (leish111f), formulada com um adjuvante monophosphoryl-lipid A (MPL-SE®) está a ser testada na Fase I e II em humanos contra leishmaniose cutânea no Novo Mundo (Fujiwara *et al.*, 2005).

O leish111f é um antígeno quimérico formado a partir de três antígenos recombinantes escolhidos por induzir uma resposta imune celular no Homem e em hamsters: antígenos recombinantes TSA (*thiol-specific-antioxidant*) e LmSTI1 (*L.major homolog of the eukaryotic stress-inducible protein-1*), obtidos da forma amastigota da espécie *L. major*, e o antígeno recombinante LelF (*leishmania elongation and initiation factor*) obtido da espécie *L. braziliensis* (Coler & Reed, 2005)

Não apresenta efeitos adversos, mas estas poliproteínas podem perder imunogenicidade devido à perda de epítomos conformacionais (Fujiwara *et al.*, 2005).

Uma outra vacina (proteína Q), baseada na fusão das proteínas LiP2b, LiP2a, LiP0 e H2A, obteve protecção de 90%, mas apenas em estudos experimentais (Doctoral & Simó, 2009).

10.3. Vacinas de 3ª geração

O avanço da biotecnologia permitiu o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas baseadas em ADN. Neste tipo de vacinas, o gene que codifica a proteína com interesse insere-se num plasmídeo bacteriano, o qual é inoculado posteriormente num indivíduo para que expresse as proteínas *in vivo*. Desta maneira, as vacinas de ADN oferecem a vantagem de mimetizar os efeitos das vacinas vivas, mas sem risco de infecção (Doctoral & Simó, 2009).

Comparando com as vacinas originadas de antígenos recombinantes, as vacinas de ADN são mais estáveis, uma vez que a estrutura das proteínas e a sua antigenicidade permanece inalterada, têm reduzido custo de produção e não necessitam de refrigeração para a sua distribuição. Apresentam ainda flexibilidade de combinação de múltiplos genes numa simples vacina (Palatnik-de-Sousa, 2008), ou seja, um único plasmídeo pode codificar vários antígenos, fornecendo protecção apenas numa única administração, contra mais de uma espécie.

Um estudo comparativo ensaiado em dois grupos de hamsters verificou que o grupo onde se utilizou um plasmídeo que incluía o gene do antígeno LACK (*Leishmania homolog of receptors activated for C kinase*) apresentava maior E.V do que em relação à vacina recombinante com o mesmo antígeno (Palatnik-de-Sousa, 2008).

10.4. Vacinas baseadas em Proteínas salivares de flebótomos

A saliva dos vectores é muito importante no estabelecimento infecção por *Leishmania*. Teoriza-se que as proteínas salivares influenciam o estado imunitário do hospedeiro e podem ter consequências sobre o resultado clínico.

Esta hipótese é comprovada em ensaios através da vacinação de roedores com ADN codificando uma proteína salivar do flebótomos, onde se obteve elevada imunização correlacionada com resposta do tipo Th1 (Collin *et al.*, 2009).

12. Controlo da leishmaniose visceral zoonótica

Estudos contemplando apenas a eutanásia massiva de cães infectados, quando separada do controlo vectorial, têm demonstrado resultados conflituosos (Amóra *et al.*, 2009).

Se nada for feito para controlar a população de vectores verifica-se uma maior probabilidade de infecção para o homem (Costa *et al.*, 2007). Por outro lado, a renovação dos animais torna a população canina mais jovem com maior susceptibilidade ao agente. Assim, programas de posse responsável, assentes na qualidade de vida dos animais, podem obter melhores resultados que meios de controlo populacional em áreas endémicas.

Dye desenvolveu um modelo matemático para avaliar as medidas de controlo da LCan, concluindo que a eutanásia massiva de cães positivos à *Leishmania*, enquanto única medida de controlo, não reduz a incidência da leishmaniose (Andrade *et al.*, 2007).

O programa de controlo da leishmaniose em zonas endémicas deve incluir um conjunto de medidas planificadas de forma rigorosa e accionadas em simultâneo (Corrales, 2007).

O programa brasileiro de controlo de leishmaniose visceral baseava a sua estratégia em três medidas principais, que objectivavam a detecção e tratamento de casos humanos, o controlo de vectores e do reservatório doméstico.

No entanto, a necessidade de um sistema de vigilância permanente, com utilização de recursos humanos e financeiros, limitou a sustentabilidade do projecto. Todavia, outros factores como a possibilidade de transmissão da doença através de cães assintomáticos, má qualidade dos procedimentos de diagnósticos e a rápida aquisição de novos cães em substituição dos cães eliminados, culminaram na ineficácia desta estratégia (Amóra *et al.*, 2009).

Assim, devemos acrescentar ao programa medidas sobre o meio ambiente, educação sanitária, vigilância epidemiológica e apoio no campo da investigação.

O controlo do vector pode ser efectuado através do uso de insecticidas (piretróides) tópicos ou em colar (aplicados em canídeos) e visa interromper ou reduzir o risco de transmissão do parasita ao hospedeiro vertebrado (Miró *et al.*, 2007). Não obstante, apesar de os flebótomos apresentarem comumente susceptibilidade aos insecticidas usados não se deve ignorar o surgimento de resistências quando utilizados de forma massiva e descontrolada.

Em certas regiões o uso de malhas ou redes mosquiteiras (0,3-0,4 mm) em casas pode reduzir drasticamente as picadas de flebótomos (Corrales, 2007).

Em relação ao controlo do reservatório, primeiramente, é fundamental o uso de meios de diagnóstico eficazes, aplicados no diagnóstico individual e nos rastreios em zonas endémicas. O tratamento e monitorização dos canídeos infectados, assim como das pessoas são fundamentais.

É necessário diminuir a exposição dos canídeos aos períodos de maior actividade dos vectores, controlar canídeos errantes e proceder à eutanásia sempre que o animal estiver num estado avançado de doença ou se não apresentar reversibilidade dos sinais clínicos, após tratamento.

Nas campanhas de adopção, apenas doar os animais sem leishmaniose. Se o proprietário não se disponibilizar para efectuar o tratamento, a eutanásia do animal será o único caminho consciente a adoptar.

As medidas sobre o meio ambiente devem contemplar a eliminação de áreas que favoreçam o desenvolvimento do vector, principalmente em zonas próximas de habitações.

Outras medidas incluem: educação sanitária; promoção de congressos; recomendações em folhetos informativos e em consultórios veterinários; estabelecer e melhorar os sistemas de vigilância epidemiológica; determinar com exactidão a capacidade infectante dos canídeos pós-tratamento; investigação sobre a importância do ciclo silvestre; apoios no campo da investigação; desenvolvimento de vacinas seguras; desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e de novas terapêuticas baratas e eficazes. (Aragón *et al.*, sd).

Estudo sero-epidemiológico da leishmaniose canina na sub-região do Pinhal Interior Sul

1. Objectivos

O presente estudo sero-epidemiológico de leishmaniose canina que inclui a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* tem os seguintes objectivos:

- Avaliar as seroprevalências, pelo método de ELISA, em cães dos concelhos de Mação, Proença-a-Nova e Vila de Rei;
- Determinar e comparar valores de seroprevalência em grupos independentes;
- Determinar e comparar factores de risco por análise estatística e análise geoespacial;
- Construir mapas, com base nos parâmetros geoespaciais analisados;
- Avaliar a importância da leishmaniose na população de cães na sub-região do Pinhal Interior Sul e o seu possível impacto na saúde pública;
- Obter informação para fundamentar, se necessário, planos de acção contra a leishmaniose;

2. Material e métodos

2.1. Área geográfica do estudo

Os concelhos de Mação, Proença-a-Nova e Vila de Rei pertencentes à sub-região do Pinhal Interior Sul constituíram as áreas geográficas alvo do presente estudo sero-epidemiológico.

O Pinhal Interior Sul é uma sub-região estatística portuguesa, integrante da região Centro e dividida entre o distrito de Castelo Branco e o distrito de Santarém. Limita a norte com o Pinhal Interior Norte e a Cova da Beira, a este com a Beira Interior Sul, a sul com o Alto Alentejo e a oeste com o Médio Tejo.

Desta área geográfica com 1.903 km² fazem parte cinco concelhos: Oleiros, Proença-a-Nova, Sertã e Vila de Rei, pertencentes ao distrito de Castelo Branco e o concelho de Mação pertencente ao distrito de Santarém.

É uma região montanhosa com planaltos férteis, profundamente recortada por vales. O rio Zêzere, com as albufeiras resultantes das três barragens que o seu leito comporta (Cabril, Bouça e Castelo de Bode), delimita a região a norte, oeste e sudoeste. No extremo este da Zona do Pinhal é o Rio Ocreza que delimita a região, e a sudeste é em parte o rio Tejo.

Como componente das actividades desenvolvidas são muitas vezes criados reservatórios de água artificiais que a par dos muitos cursos de água naturais contribuem para a elevada humidade característica da região (Silva, 2009).

As actividades económicas da região estão repartidas entre os três sectores e mesmo que em muitas aldeias a vida se processe em torno de actividades tradicionais, os concelhos têm visto o florescimento de indústrias de primeira transformação que tem desempenhado um papel de relevo e projecção na economia dos concelhos.

Das principais actividades desenvolvidas na região destaca-se a exploração florestal onde predomina o pinheiro-bravo e eucalipto, indústria de serração de madeiras, suinicultura, caprinicultura e actividade cinegética. Contudo, apesar da grande riqueza que constitui a floresta, de acordo com os censos realizados, a zona do Pinhal é na maior parte do território que a compõe, uma região cada vez mais deprimida com baixos índices de rendimento e perda de população. Pelas mesmas razões observa-se uma diminuição do número de cães que se apresentam anualmente na campanha de vacinação anti-rábica.

Em Julho de 2010, foram assinalados na campanha de vacinação anti-rábica um total 2076 cães, respectivamente 802 no concelho de Mação, 865 no de Proença-a-Nova e 409 em Vila de Rei.



Figura 25 - Sub - região do Pinhal Interior Sul

2.2. Estudo por amostragem

Nestes três concelhos, durante a campanha de vacinação anti-rábica efectuada no mês de Julho do ano 2010 foram obtidas amostras de sangue de 282 cães (262 pertencentes a proprietários privados e 20 provenientes do canil municipal de Proença-a-Nova).

O cálculo do número de amostras de sangue necessário para a realização do presente estudo por amostragem baseou-se nos resultados obtidos pelo software “Winepi”, que para uma população estimada de 2000 cães e uma prevalência esperada de 30%, com um intervalo de

confiança de 95% e um erro de 5%, indicava uma fracção de amostragem ajustada de 278 amostras de sangue necessárias, representando 13,9% da população estimada.

A metodologia adoptada para evitar o vício amostral e obter uma amostra representativa, idónea e aleatória da população de cães baseou-se na recolha de uma amostra de sangue a cada sete ou oito cães, amostragem sistemática.

2.3. Recolha das amostras de sangue

A colheita de sangue foi executada do seguinte modo:

Com o cão imobilizado pelo dono, realizou-se a desinfecção da pele com álcool etílico a 70% e de seguida efectuou-se a punção da veia cefálica, safena ou jugular, com ou sem recurso a garrote, utilizando seringas de 5 ml e agulhas de 21 G.

Foram recolhidos cerca de 5 ml de sangue por cada animal, 2 ml de sangue para tubo seco e 3 ml para tubo com EDTA.



Figura 26 - Recolha de amostra de sangue

2.4. Caracterização da amostra

Para cada cão, mediante um inquérito efectuado ao dono, foram registadas as seguintes informações: nome do dono, número de telefone, proveniência do animal e respectivo código postal com sete algarismos, nome do cão, sexo, idade, habitat, aptidão, tamanho do pêlo, sendo finalmente efectuada uma observação clínica e registada a presença de eventuais sinais clínicos compatíveis com leishmaniose (anexo 2).

2.5. Técnica laboratorial

O soro recolhido do tubo seco foi utilizado para detectar anticorpos específicos anti-*Leishmania*.

O sangue do tubo com EDTA permitiu obter sangue total, plasma e “buffy coat” (capa de leucócitos), com a finalidade de formar um banco de tecidos sanguíneos congelados disponíveis para futuramente avaliar outros parâmetros relacionados com a leishmaniose canina.

Foi também efectuado um esfregaço de sangue para pesquisa de hemoparasitas, como *Babesia* spp, *Theileria* spp e *Anaplasma* spp.

A Figura 27 mostra o material necessário e o espaço usado para o processamento prévio das amostras de sangue.

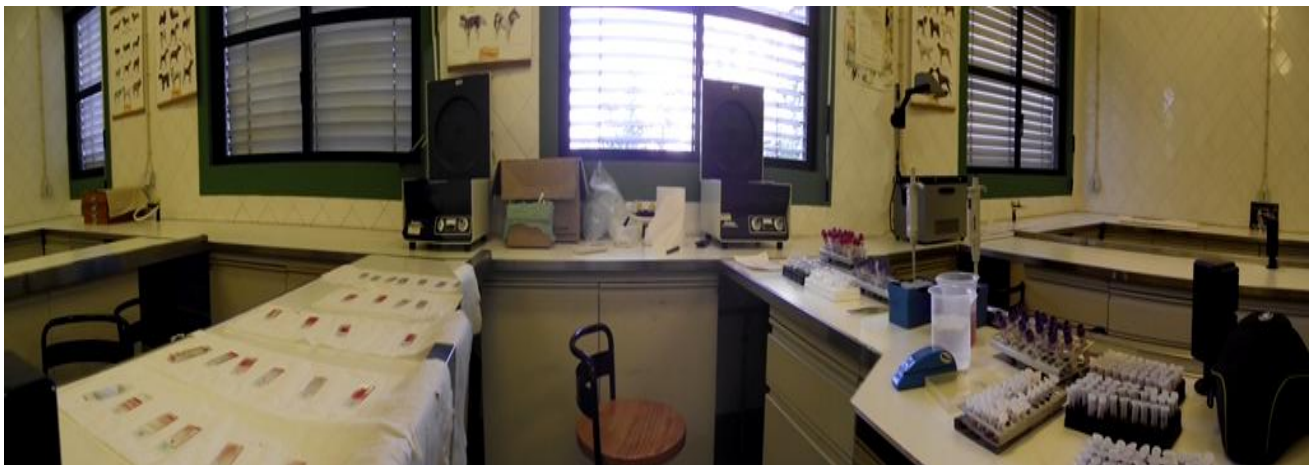


Figura 27 - Processamento prévio das amostras no laboratório da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

2.5.1. Processamento prévio da amostra

2.5.1.1. Material

- Lâminas (400)
- Pinça
- Suportes de tubo de ensaio
- Pontas: 200µl; 1000µl
- Micropipeta; 200µl; 1000µl
- Fita-cola
- Centrifugadora
- Tubos secos (300)
- Tubos com EDTA (300)
- Caneta de acetado

- Luvas e sacos de plástico
- Tubos de 2 ml (1200)

2.5.1.2. Método de processamento prévio da amostra

Identificar quatro tubos de 2 ml com letras diferentes (A;B;C;D) para cada uma das amostras de sangue

Tubo seco

- Centrifugar a 1500 rpm durante 30 min e recolher o soro para o tubo A;

Tubo com EDTA

- Recolher 200 µl de sangue total para tubo B (Fig. 28);
- Efectuar um esfregaço com uma gota de sangue (Fig. 29);
- Centrifugar o tubo com EDTA (2000 rpm, 30 min, sem travão);
- Recolher “buffy coat” para tubo C;
- Recolher 200 µl do plasma para tubo D;
- Conservar todos os tubos de 2 ml a -20 °C;
- Antes de iniciar a realização do teste de ELISA é necessário proceder à descongelação dos soros nos tubos de 2 ml, mantendo-os a 4 °C;



Figura 28 - Recolha das fracções descritas para tubos de 2 ml

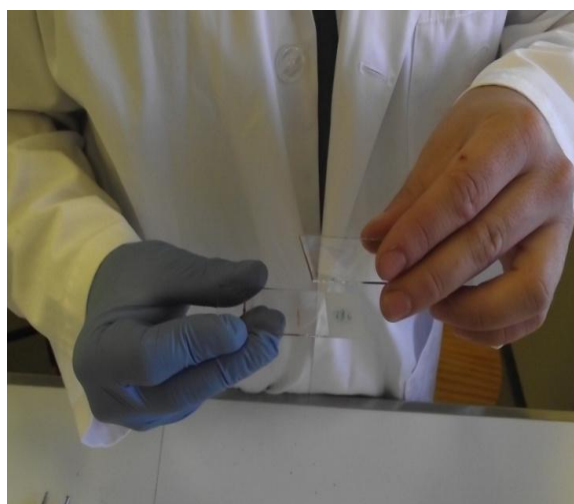


Figura 29 - Esfregaço por gota de sangue

2.5.2. Técnica de ELISA

O vínculo entre a resposta humoral e a produção de anticorpos anti-*Leishmania* pelos cães com leishmaniose consente o uso do método serológico (ELISA) como preferencial, apresentando especial interesse em situações de campo (Miró *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2007; Campino & Maia, 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Por outro lado, o diagnóstico parasitológico não é suficientemente sensível e/ou prático e a elevada proporção de cães infectados assintomáticos confirma que a detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* subsiste como o método de escolha para o rastreio de cães em estudos epidemiológicos e avaliação da respectiva seroprevalência (Cardoso, 2004; Brancal *et al.*, 2009).

Neste sentido, foi escolhido a técnica de ELISA, dado tratar-se de um método objectivo de leitura espectrofotométrica, facilmente automatizável para uma grande número de amostras (Campino & Maia, 2008; Doctoral & Simó, 2009).

No presente estudo, o protocolo de ELISA indirecto que seguidamente se descreve, foi preparado no Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro, segundo adaptação do protocolo usado no Instituto de Parasitologia da Universidade de Berna, Suíça.

O antígeno utilizado foi extracto solúvel total de uma cultura de promastigotas de *Leishmania infantum* obtido após rotura das células do parasita.

2.5.2.1. Protocolo de ELISA para *Leishmania infantum*

2.5.2.1.1. Material

- Placas de diagnóstico com 96 poços (NUNC-Immunomodel C8 Maxi Breakapart, 96 poços - número de ordem: 473768)
- Câmara de fluxo laminar
- Incubadora a 37°C
- Banho-maria
- Balança digital
- Micropipetas de 2 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl
- Pontas de 2 µl; 20 µl; 200 µl; 1000 µl
- Pipetador
- Pipetas graduadas, 10 ml
- Provetas
- Tubos de plástico, 50 ml
- Copos de becker, 100 ml; 500 ml
- Suporte para tubos de ensaio
- Frasco de vidro 1 L
- Tubo de 2 ml
- Tubos de ensaio

2.5.2.1.2. Soluções e reagentes

As preparações das soluções estão descritas no anexo 3

- Solução tampão para carregamento
- Solução tampão de lavagem
- Solução tampão de diluição
- Solução tampão substrato (base)
- Ac anti-cão IgG-conjugado com fosfatase (Sigma Chemical Company; Product Number A-0705; Lot-Nr. In use 122K4825)
- Solução de paragem da reação com fosfatase (solução de hidróxido de sódio);
- Soro de bovino
- Antigénio

2.5.2.1.3. Soluções finais a aplicar na placa de diagnóstico

- Solução de saturação: 1 ml de soro de bovino + 99 ml de solução de diluição (1:100)
- Solução de Ac anti-cão IgG-conjugado (1:6000): 1,83 µl Ac anti-cão IgG-conjugado + 11ml de solução de diluição
- Solução de soro diluído: 990 µl de solução de diluição+10 µl de soro da amostra (1:100)
- Solução tampão de substrato: 11µg de tetranitrofunilfosfato + 11 ml de solução tampão substrato (base)
- Diluição do antígeno (Anexo 4): 0,329 ml de Ag (C=1520µg/ml) + 24,67 ml de solução de carregamento
- Grupo controlo
 - Controlo negativo: 990 µl de solução de diluição +10 µl de soro de animal negativo a infecção por *Leishmania infantum* (1:100)
 - Controlo positivo: 990 µl de solução de diluição +10 µl de soro de animal positivo a infecção por *Leishmania infantum* (1:100)
 - Branco: 1000 µl de solução de diluição

2.5.2.1.4. Método

- Preparar as soluções (Anexo 3) de modo a obter as soluções finais acima descritas. A Figura 30 ilustra a preparação de soluções;
- Identificar 8 placas de ELISA (concentração de antígeno, número da placa, data e nome) com caneta de acetato (Fig. 31);
- Carregamento - adicionar em cada poço 50 µl do antígeno diluído com uma concentração de 1 µg/50 µl (Fig. 32);

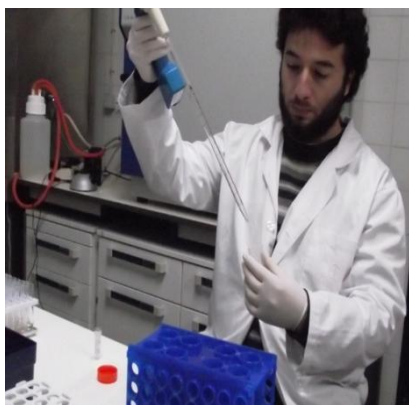


Figura 30 – Preparação de soluções

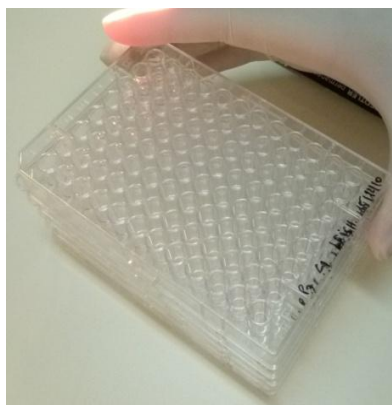


Figura 31 – Identificação das placas de ELISA

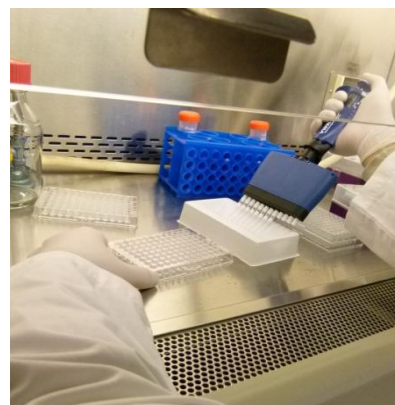


Figura 32 – Carregamento da placa de diagnóstico

- Incubar as placas, 16 horas a T 4°C, envolvidas por filme autocolante;
- Retirar o sobrenadante;

- Lavar 4 vezes com 200 µl/poço de solução de lavagem;
- Colocar as placas a - 20°C, até ao processamento das amostras;
- Colocar 200 µl de solução de saturação em cada poço;
- Incubar a placa a 37 °C, durante 20 minutos;
- Lavar a placa 1 vez com 200 µl/poço de solução de lavagem;
- Colocar na distribuição pré-definida, 100µl em cada poço de:
 - Solução de Controlos negativos
 - Solução de Branco
 - Solução de Positivo
 - Solução de Soro diluído
- Incubar a placa a 37 °C, durante 30 minutos;
- Lavar 3 vezes a placa com 300 µl em cada poço de solução de lavagem;
- Colocar 100 µl em cada poço de Ac anti-cão IgG-conjugado (excepto no branco);
- Incubar a placa a 37 °C, durante 30 minutos;
- Lavar a placa, 4 vezes, com 300 µl/ poço de solução de lavagem;
- Colocar 100 µl em cada poço de solução de substrato *buffer*;
- Incubar a placa a 37 °C, durante 5 minutos;
- Efectuar a leitura da placa de diagnóstico (Fig. 33);

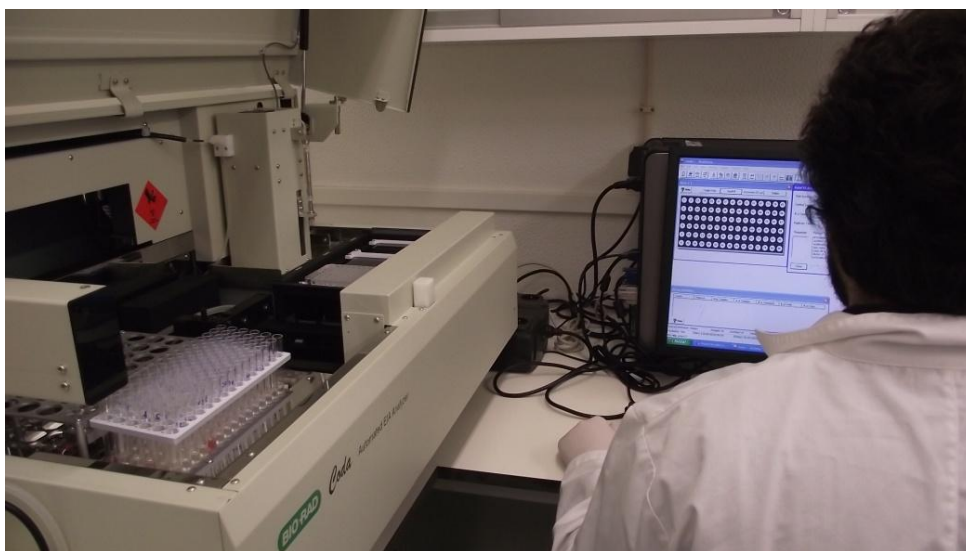


Figura 33 - Leitura da placa de diagnóstico

- Incubar a placa a 37 °C, durante 5 minutos;
- Efectuar a leitura da placa (405 nm);
- Incubar a placa a 37 °C, durante 10 minutos;
- Efectuar a leitura da placa (405 nm);

- Parar a reacção com solução de hidróxido de sódio (NaOH);

2.5.2.2. Interpretação

O resultado positivo baseia-se na ligação do antígeno solúvel adsorvido à placa ao anticorpo presente no soro do cão. A aplicação do conjugado associado a uma enzima (fosfatase) e a um substrato apropriado ao tipo de enzima permite a leitura dos resultados (Fig. 34), através de leitura espectrofotométrica (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

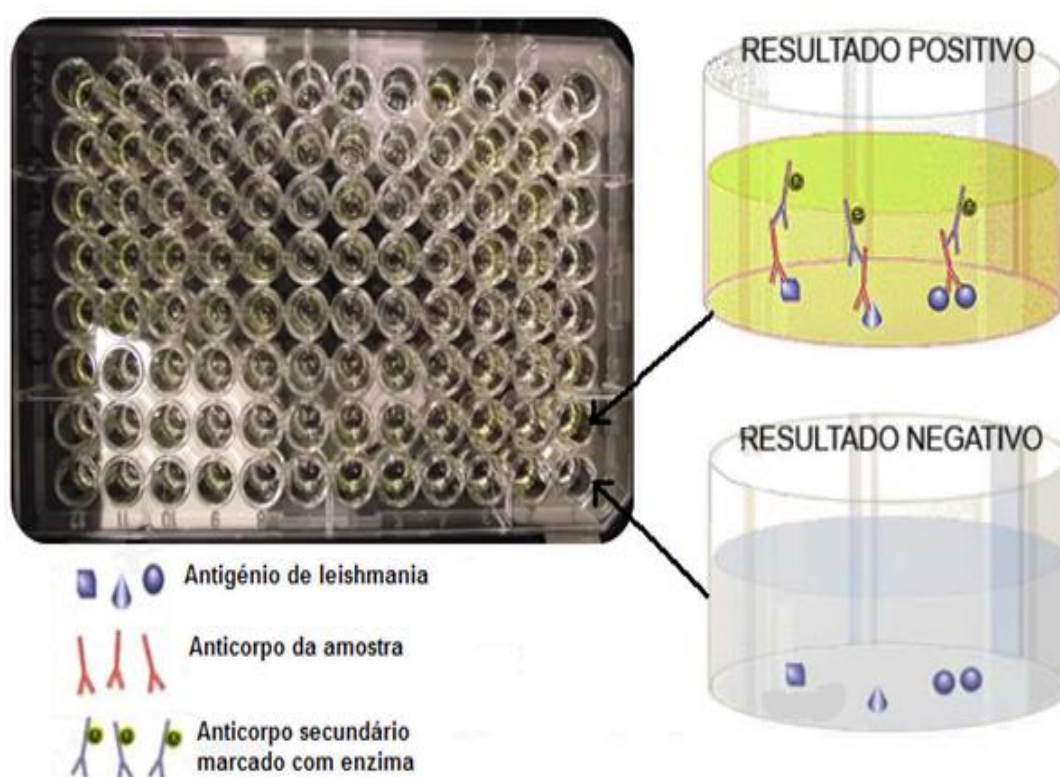


Figura 34 – Interpretação dos resultados obtidos (adaptado de Doctoral & Simó, 2009)

2.6. Análise estatística

Para processamento da informação recolhida, introduziram-se os dados na folha de cálculo do programa informático Microsoft® Excel onde foram utilizados métodos de estatística descritiva

(média, moda, mediana, desvio padrão, frequência absoluta e frequência relativa).

O "cut-off" (limiar de positividade - índice que determina o limite a partir do qual o exame serológico é considerado positivo ou negativo) foi calculado através da média de valores dos controlos negativos, de cada placa de diagnóstico, mais a soma de 3 desvios - padrão.

Para comparar os valores de seroprevalência pela presença de anticorpos anti-*Leishmania* em grupos independentes, utilizaram-se métodos de análise estatística não paramétrica, nomeadamente o teste estatístico Qui-quadrado (χ^2), através do programa SPSS 17.0 statistics para Windows, considerando-se para um nível de probabilidade (p) $<0,05$ diferença entre proporções (seroprevalência) estatisticamente significativa.

Na identificação de factores de risco independentes para a seroprevalência, pela presença de anticorpos anti-*Leishmania*, utilizou-se a regressão logística múltipla, calculando "odds ratios"-OR, (razão de possibilidades ou razão de produtos cruzados) e os seus intervalos de confiança (IC) a 95%. Com base na escolha das variáveis em estudo que apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre proporções. A análise foi feita com recurso ao programa SPSS 17.0 statistics para Windows, considerando-se igualmente um nível de probabilidade (p) $<0,05$ como estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1. Análise estatística descritiva e análise não paramétrica

3.1.1. Seroprevalência e origem

A Tabela 8 inclui os resultados obtidos das seroprevalências pela presença de anticorpos anti-*Leishmania*, referentes às 282 amostras recolhidas a cães, processadas através da técnica de ELISA, nos concelhos de Mação, (15,7%; IC: 8,9-25,0), Proença-a-Nova (29,4%; IC: 22,1-37,6) e Vila de Rei (56,0%; IC: 41,2-70,0).

Observa-se que foram recolhidas 89 amostras de sangue a cães no concelho de Mação, sendo 14 seropositivos, em Proença-a-Nova 143, sendo 42 seropositivos e em Vila de Rei 50, sendo 28 seropositivos.

Em relação aos concelhos podemos dizer que existe diferenças estatisticamente significativas entre as seroprevalências encontradas nos concelhos. Mação vs. Proença-a-Nova: ($p = 0,028$); Mação vs. Vila de Rei: ($p < 0,001$); Proença-a-Nova vs. Vila de Rei: ($p = 0,001$).

Tabela 8 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti - *Leishmania* nos concelhos de Mação, Proença-a-Nova e Vila de Rei

Concelho	Animais testados (n)	Distribuição relativa (%)	ELISA- positivos (n)	Seroprevalência (%)	IC 95%
Mação	89	31,6	14	15,7	8,9-25,0
Proença-a-Nova	143	50,7	42	29,4	22,1-37,6
Vila de Rei	50	17,7	28	56,0	41,2-70,0
total	282	100	84	29,8	24,1-44,2

Mação vs. Proença-a-Nova: $p = 0,028$

Mação vs. Vila de Rei: $p < 0,001$

Proença-a-Nova vs. Vila de Rei: $p = 0,001$

Em relação à divisão das freguesias na categoria rural ou semi-urbana, os valores de seroprevalência obtidos são 27,5% (IC: 24,7-42,9) e 33,3% (IC: 20,9-34,8) respectivamente, sendo que, 80,9% das amostras foram recolhidas em freguesias rurais (Tabela 9). Comparando as seroprevalências provenientes dos cães de freguesias rurais e semi-urbanas, não se observa diferença estatisticamente significativa ($p=0,376$)

A classificação das freguesias por densidade populacional é fundamentada no anexo 5.

Tabela 9 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti - *Leishmania* em meio rural e semi-urbano

Freguesia	Animais testados (n)	Distribuição relativa (%)	ELISA- positivos (n)	Seroprevalência (%)	IC 95%
Rural	228	80,9	58	27,5	24,7-42,9
Semi-urbana	54	19,1	26	33,3	20,9-34,8
Total	282	100	84	29,8	24,5-35,5

$P = 0,376$

3.1.2. Sexo

Dos 282 cães, 173 são do sexo masculino (61,3%), e 109 do sexo feminino (38,7%).

Os valores de seroprevalência entre machos e fêmeas foram 27,6% e 33,3% respectivamente, não tendo sido encontrada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,372$) entre os níveis de seroprevalência relativamente ao sexo dos animais (Tabela 10).

Tabela 10 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti - *Leishmania* segundo o Sexo

Sexo	Animais testados (n)	Distribuição relativa (%)	ELISA- positivos (n)	Seroprevalência (%)	IC 95%
Macho	173	61,3	48	27,6	21,1-34,9
Fêmea	109	38,7	36	33,3	24,5-43,0
total	282	100	84	29,8	24,5-35,5

$P = 0,372$

3.1.3. Comprimento do pêlo

Em relação ao comprimento do pêlo dos cães registaram-se 174 cães (61%) com pêlo curto, 86 (30,5%) com pêlo médio e 22 (7,8%) com pêlo comprido, sendo as seroprevalências respectivas 34,5% (IC: 27,4-42,0); 22,1% (IC: 13,9-32,3); 22,7% (IC: 8-45,4).

O valor $p=0,086$ indica que não há diferença estatisticamente significativa entre as seroprevalências dos grupos de cães categorizados com diferentes comprimentos de pêlo (Tabela 11).

Tabela 11 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti - *Leishmania* segundo o comprimento do pêlo

Pêlo	Animais testados (n)	Distribuição relativa (%)	ELISA- positivos (n)	Seroprevalência (%)	IC 95%
Curto	174	61,7	60	34,5	27,4-42,0
Médio	86	30,5	19	22,1	13,9-32,3
Comprido	22	7,8	5	22,7	7,8-45,4
total	282	100	84	29,8	24,5-35,5

$P=0,086$

3.1.4. Aptidão

Do total de cães analisados, 52 animais (18,4%) tinham como função ser de companhia, 91 (32,3%) de guarda, 119 (42,2%) de caça e 20 (7,1%) não tinham dono, pelo que foram classificados como errantes.

Os valores de seroprevalência obtidos encontram-se descritos na tabela 12, sendo que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as seroprevalências dos cães com diferentes funções, com excepção dos grupos “guarda” vs. “errante” ($p = 0,035$).

Tabela 12 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti - *Leishmania* segundo a aptidão

Aptidão	Animais testados (n)	Distribuição relativa (%)	ELISA- positivos (n)	Seroprevalência (%)	IC 95%
Companhia	52	18,4	12	23,1	12,5-36,8
Caça	119	42,2	36	30,3	22,2-39,4
Guarda	91	32,3	34	37,4	27,4-48,1
Errante	20	7,1	2	10,0	1,2-31,7
Total	282	100	84	29,8	24,5-35,5

Companhia versus Caça: $p = 0,438$ Companhia vs. Guarda: $p = 0,116$ Companhia vs. Errante: $p = 0,322$ Caça vs. Guarda: $p = 0,350$ Caça vs. Errante: $p = 0,108$ Guarda vs. Errante: $p = 0,035$

3.1.5. Habitat

Relativamente ao habitat dos animais, observa-se que 41 animais (14,5%) pertenciam ao grupo “casa”, 35 (12,4%) pertenciam ao grupo misto “casa/rua”, 186 (66%) pertenciam ao grupo “rua” e 20 (7,1%) pertenciam ao grupo “errantes”.

Relativamente ao habitat dos cães não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,054$) de seroprevalência entre os grupos avaliados (Tabela 13).

Tabela 13 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti - *Leishmania* segundo o habitat

Habitat	Animais testados (n)	Distribuição relativa (%)	ELISA- positivos (n)	Seroprevalência(%)	IC 95%
Casa	41	14,5	10	22,5	10,8-38,4
Casa/Rua	35	12,4	14	40,0	23,9-57,9
Rua	186	66	58	31,6	25,0-38,7
Errante	20	7,1	2	10,0	1,2-31,7
Total	282	100	84	29,8	24,5-35,5

 $p = 0,054$

3.1.6. Idade

As idades foram agrupadas em 3 grupos de acordo com o número de épocas de transmissão a que o animal foi exposto. As épocas correspondem ao período médio em que o flebótomo se encontra activo, de Abril a Outubro (Fig. 35).

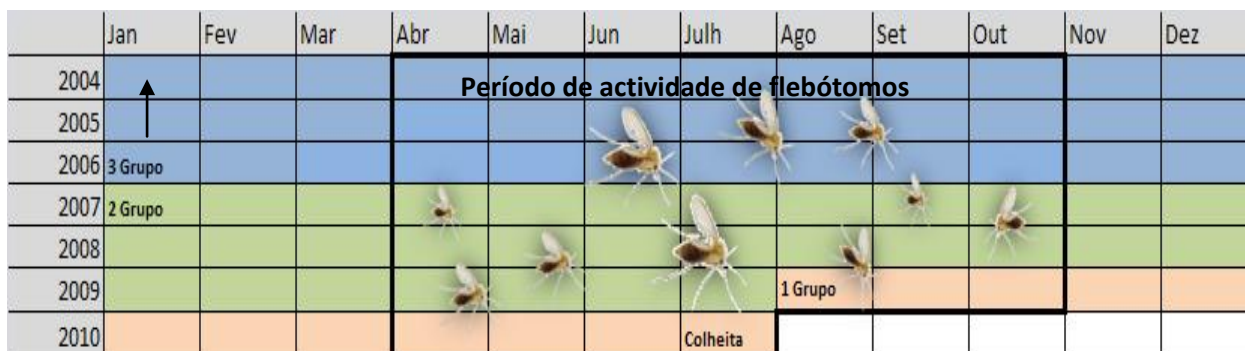


Figura 35 – Épocas de transmissão a que os animais foram expostos

A média de idade da população total de cães foi de 4,84 anos, sendo a idade máxima registada de 14 anos e a mínima de 8 meses. A moda foi de 2 anos e a mediana de 4. Todavia, a vinte animais não foi possível apurar a idade com precisão, dado tratar-se de animais errantes (pertencentes ao canil de Proença-a-Nova).

Em relação aos animais seropositivos, a média de idade foi de 5,4 anos, a idade máxima de 11 anos, a mínima de 8 meses, a moda de 5 anos e a mediana de 5 anos.

No grupo 1 (0-12 meses) obteve-se um valor de seroprevalência de 4,8% (IC: 0,1-23,8), no grupo 2 (13 meses-4 anos) de 26,2% (IC:18,8-34,6) e no grupo 3 (≥ 5 anos) de 37,4% (IC: 29,1-46,3).

Quando avaliados os 3 grupos etários em conjunto obteve-se um valor de $p = 0,002$, o que indica que existe diferença estatisticamente significativa. Para as comparações de seroprevalência de 2 grupos etários temos: grupo 1 vs. grupo 2: $p = 0,046$; grupo 1 vs. grupo 3: $p = 0,007$; grupo 2 vs. grupo 3: $p = 0,055$, indicando que apenas não existe diferenças estatisticamente significativas entre o grupo 2 e 3 (Tabela 14).

Tabela 14 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti - *Leishmania* segundo o grupo etário

Grupo etário (idade)	Grupo etário (épocas)	Animais testados (n)	Distribuição relativa (%)	ELISA-positivos (n)	Seroprevalência (%)	IC 95%
G1 0-12 meses	<1	21	7,4	1	4,8	0,1-23,8
G2 13 meses - 4 anos	1- 3,5	130	46,1	34	26,2	18,8-34,6
G3 ≥5 anos	≥3,5	131	46,5	49	37,4	29,1-46,3
total	100	282	100	84	29,8	24,5-35,5

Comparação dos 3 grupos $p=0,002$

Grupos 1 vs. grupo 2, $p = 0,047$

Grupos 1 vs. grupo 3, $p = 0,007$

Grupos 2 vs. grupo 3, $p = 0,069$

A Figura 36 relaciona as épocas de transmissão com a seropositividade apresentada pelos animais e a seroprevalência.

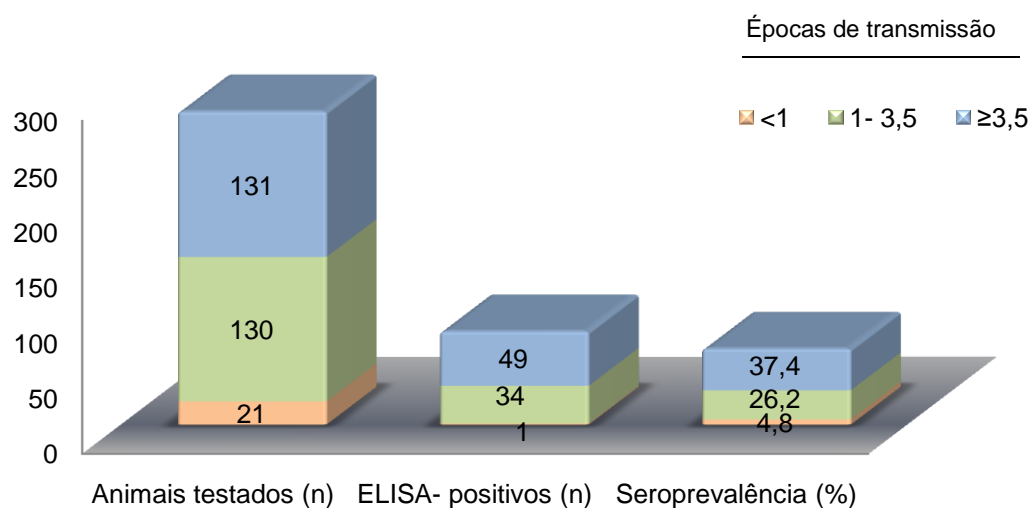


Figura 36 – Relação entre as épocas de transmissão e as seroprevalências

3.1.7. Sinais clínicos

Os animais foram todos inspeccionados e considerados suspeitos aquando da observação de pelo menos um sinal clínico compatível com leishmaniose. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,002$) entre os níveis de seroprevalência e os sinais clínicos dos animais (Tabela 15).

Tabela 15 - Seroprevalência por detecção de anticorpos anti - *Leishmania* segundo os sinais clínicos

Sinais clínicos	Animais testados (n)	Distribuição relativa (%)	ELISA- positivos (n)	Seroprevalência (%)	IC 95%
Não	228	81	58	25,4	19,9-31,6
Sim	54	19	26	48,1	34,3-62,2
total	282	100	84	29,8	24,5-35,5

$p = 0,002$

Foi possível assinalar 54 animais (19%) com sinais clínicos compatíveis com leishmaniose, obtendo-se neste grupo um valor de seroprevalência de 48,1%. Por outro lado, quando não foi assinalado nenhum sinal clínico - 228 animais (81%) - podemos observar, pela Figura 37, que o valor obtido de seronegatividade foi de 74,6%.

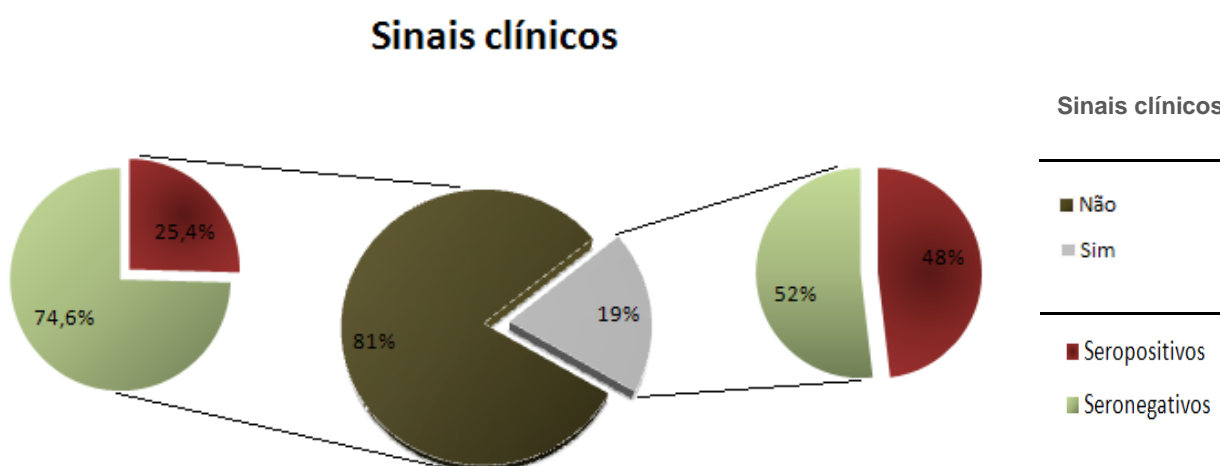


Figura 37 – Relação entre os sinais clínicos e a seropositividade por detecção de anticorpos anti- *Leishmania*

3.1. Análise de dados por regressão logística múltipla

Os OR foram calculados com a finalidade de determinar factores de risco associados à seropositividade por presença de anticorpos anti-*Leishmania*. Neste sentido, foram calculados os OR para as variáveis concelho, aptidão, idade e sinais clínicos (Tabela 16).

Pode-se observar que, o concelho é factor de risco. Os cães de Proença-a-Nova apresentam um valor de OR de 2,6 (IC 95%: 1,3-5,3) o que significa que têm 2,6 vezes mais probabilidade de estar seropositivos do que os cães de Mação, cujo OR de 1,0 é considerado de referência (pois é o concelho que apresenta uma seroprevalência menor). Os cães de Vila do Rei têm um valor de OR de 6,9 (IC 95%: 3,0-16,0) em relação aos cães de Mação, o que significa que têm 6,9 vezes mais de probabilidade de estar seropositivos do que os cães de Mação. Quanto ao tipo de aptidão, podemos observar que não é considerado um factor de risco.

Em relação à idade considera-se apenas o último grupo etário como factor de risco, pois apresenta um valor de $p = 0,049$.

Os sinais clínicos apresentados pelos animais, de acordo com o nosso estudo, apresentam uma seropositividade maior do que os cães sem sinais clínicos 1,1-4,2 vezes, IC 95%, $p = 0,028$.

Tabela 16 - Regressão logística na identificação de factores de risco para a seroprevalência por detecção de anticorpos anti - *Leishmania* nos três concelhos

Factor	Serprevalência	OR (%)	IC 95%	Valor de p
Aptidão				
Companhia	23,1	1		0,179
Caça	30,3	1,64	0,724 - 3,725	0,235
Guarda	37,4	1,88	0,817 - 4,322	0,137
Errante	10	0,45	0,085 - 2,365	0,345
Concelho				
Mação	15,7	1		0,000
Proença-a-Nova	29,4	2,6	1,3-5,3	0,008
Vila de Rei	56,0	6,9	3,0-16,0	0,000
Idade (Épocas)				
G1 (<1)	4,8	1		0,077
G2 (1- 3,5)	26,2	5,4	0, 674 - 43,335	0,112
G3 ($\geq 3,5$)	37,4	8,1	1,013 - 65,170	0,049
Sinais clínicos				
Não	25,4	1		
Sim	48,1	2,1	1,1-4,2	0,028

4. Discussão

O rastreio efectuado nos três concelhos com áreas contíguas, permitiu determinar as respectivas seroprevalências de LCan pela presença de anticorpos anti-*Leishmania*. Em Mação obteve-se um valor de seroprevalência de 15,7%, à semelhança do que foi encontrado por Brancal *et al.*, (2009), através do teste de aglutinação directa (DAT) onde foi observado um nível de seroprevalência de 18,9%. Comparando os resultados, podemos observar que não existe diferença estatisticamente significativa entre os dois estudos ($p = 0,514$).

Neste concelho observaram-se cães seropositivos em grande parte das freguesias. Os valores de seroprevalência obtidos nas freguesias observadas variaram entre 0,0% (Carvoeiro) e 27,2% (Penhascoso).

No concelho de Vila de Rei obteve-se um valor de seroprevalência de 56,0%, tendo sido encontrados cães seropositivos nas três freguesias. Os valores de seroprevalência obtidos variaram entre os 43,2% (Vila de Rei) e os 100% (São João do Peso).

No concelho de Proença-a-Nova obteve-se um valor de seroprevalência de 29,4%, tendo sido observados cães seropositivos em todas as freguesias. Os valores de seroprevalência variaram entre os 15% (Peral) e os 75% (Alvito da Beira).

É importante referir que alguns valores de seroprevalência por freguesia, podem ser influenciados pelo pequeno número de amostras de sangue recolhidas, como é o caso de São João do Peso, em que apenas foram rastreados 2 canídeos.

No concelho de Proença-a-Nova, assim como nos outros concelhos, o carácter endémico da LCan é compatível com a informação adicional que poderá ser obtida através de inquéritos nos concelhos limítrofes, da identificação de casos humanos (anexo 1), pela investigação de vectores e também pela caracterização das estirpes de *Leishmania* envolvidas na infecção (Brancal *et al.*, 2009). Contudo, uma vez que não existe nenhum estudo anterior similar nos concelhos de Vila de Rei e de Proença-a-Nova, não podemos estabelecer comparação de seroprevalências, no sentido de avaliar se existe diferença estatisticamente significativa com o presente estudo.

As variações de seroprevalências encontradas entre populações caninas nos três concelhos contíguas podem ser explicadas devido às condições ecológicas que determinam a abundância de flebótomos como agentes focalizadores, dentro de uma área endémica (Brancal *et al.*, 2009). Podemos ainda indicar todas as medidas preventivas da picada do flebótomo aplicadas a um canídeo. Assim se explica que quando efectuada análise de regressão logística múltipla, se observem diferenças entre os riscos de um cão ser seropositivo dependendo do sítio de proveniência. Verifica-se que, o concelho de Proença-a-Nova apresenta um risco de seropositividade por infecção de *Leishmania* de 2,6 vezes e os cães de Vila de Rei 6,9 vezes superior ao de um cão do concelho de Mação.

Verificou-se neste estudo, que o número de machos - 173 (61,3%) - em relação ao número de fêmeas - 69 (38,7%) - foi consideravelmente maior. Dados similares de outros autores indicam que existe provável representatividade da amostra em relação à população de cães existente na região (Miranda *et al.*, 2008), contribuindo para fundamentar que os resultados obtidos podem ser imputados à população inteira.

Em relação ao sexo dos cães não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas de seroprevalências tal como descrito por outros autores que consideram que o género não é um factor de risco para o desenvolvimento de LCan (Ciaramella & Corona, 2003a; Miranda *et al.*, 2008). No entanto, devem ser consideradas todas as variáveis relacionadas com a exposição aos flebótomos.

Quando se comparam as seroprevalências da amostra relativamente à variável comprimento do pêlo, verifica-se que não podemos relacionar esta com os valores de seroprevalência para cada grupo (pêlo curto, médio e comprido), embora tenha sido registada maior seroprevalência no grupo de cães com pêlo mais curto 34,5% comparativamente com o grupo de cães de pêlo médio e comprido, 22,1% e 22,7%, respectivamente. Estes dados são concordantes com outros autores (Coelho *et al.*, 2006).

Em relação à variável sinais clínicos, podemos salientar a ocorrência de uma associação entre os animais seropositivos e os animais sintomáticos (48% de concordância), o que é espectável, pois entre os canídeos infectados haverá mais animais com sinais clínicos de leishmaniose e com seropositividade. Todavia, no presente estudo 52% dos animais com sinais clínicos compatíveis com leishmaniose apresentaram seronegatividade. Por outro lado, entre os animais assintomáticos que não apresentaram nenhum sinal compatível com leishmaniose, 25% foram seropositivos. Pode-se confirmar que a inespecificidade dos sinais clínicos observados nesta doença ditam a necessidade de comprovar o diagnóstico com métodos serológicos ou parasitológicos fiáveis (Cardoso, 2004).

Os sinais clínicos não podem ser considerados um factor de risco, uma vez que não constituem uma causa, mas sim uma consequência da doença, ou seja, não é pelo facto de o canídeo apresentar sinais clínicos que tem maior probabilidade de ser infectado.

A diferença entre valores de seroprevalências e a variável idade é descrita por diversos autores, considerando que quanto mais épocas ou ciclos de transmissão de leishmaniose o cão esteve exposto, maior a probabilidade de estar infectado (Miró *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2006).

No presente estudo verifica-se diferença de valores de seroprevalência entre os três grupos, pelo que os animais expostos apenas até uma época de transmissão de Lcan (grupo 1) obtiveram um valor de seroprevalência (4,8%) inferior ao obtido por cães que estiveram expostos a mais ciclos de transmissão, grupo 2 (27,2%) e grupo 3 (37,4%).

Apenas entre o grupo 2 e 3 não se verifica uma diferença estatisticamente significativa de seroprevalências.

Calculando o OR, quando ajustado às variáveis, concelho, sinais clínicos e aptidão, verifica-se que o 3º grupo etário constitui um factor de risco ($p = 0,049$), sendo que um canídeo que foi exposto a mais de 3,5 épocas de transmissão de leishmaniose por flebótomos apresenta 8,1 vezes maior risco de ser infectado do que um animal que foi exposto menos de uma época de transmissão. Segundo Baneth *et al.*, (2008) um animal quando exposto sem protecção numa área endémica por mais de três épocas consecutivas apresenta uma probabilidade de estar infectado de 97,3%.

Segundo Miranda *et al.*, (2008), a variável idade apresenta uma tendência de distribuição de seroprevalência bimodal, existindo maior seroprevalência em animais jovens e em animais velhos (sete anos). Esta situação pode ser explicada pelo facto de os animais jovens possuírem um sistema imunitário mais vulnerável que os tornam mais susceptíveis a qualquer tipo de infecção. Nos animais velhos, o desenvolvimento da leishmaniose parece estar relacionado com o surgimento de outras doenças concomitantes, que contribuem para a quebra da imunidade e do equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro (Miranda *et al.*, 2008; pinhão, 2009).

Apesar do período de seroconversão ser de 1,5-3 meses (Moreno *et al.*, 1999), é possível ser detectado um animal seropositivo com menos de um ano de idade, como demonstrado num estudo efectuado a 137 cães, onde se assinalou um animal seropositivo com 8 meses (Pinhão, 2009).

Através do inquérito efectuado aos donos, constatou-se que, em relação ao parâmetro habitat, embora houvesse quatro tipos de habitat possíveis para agrupar o animal, ocorria homogeneidade quanto ao tipo de exposição aos flebótomos. As freguesias são maioritariamente caracterizadas como áreas rurais, onde tipicamente os cães são deixados à solta, ou presos no quintal. Mesmo quando foram categorizados no “habitat casa”, verificou-se que tinham quase sempre acesso ao exterior, sendo poucos os donos que pareciam demonstrar cuidados na prevenção à picada de flebótomos. Assim, como esperado, não foram obtidas diferenças estatisticamente significativas quando se comparam as seroprevalências nos diferentes tipos de habitat. No entanto, os cães errantes, contrariamente ao esperado, apresentaram menor seropositividade (10%). Segundo resultados preliminares, não publicados, no mesmo canil, em anos anteriores, também se observou uma seroprevalência de aproximadamente 5%, através da técnica de DAT.

Estes dados levantam uma série de questões e suposições ao encontro de uma explicação. Será que os animais errantes, por estarem bem alimentados no canil, se tornam assintomáticos? Será que adquiriram maior resistência por serem animais vadios? Será que quando são vadios naturalmente morrem, ou quando não têm um aspecto saudável a população residente acaba por eliminá-los, diminuindo artificialmente a seropositividade por *Leishmania*?

Está provado que determinadas raças autóctones de regiões em que a leishmaniose é endémica, como o Podengo Ibicenco, são resistentes à leishmaniose, pensando-se que uma característica específica genética predispõe à resposta imunitária do tipo celular (Solano-gallego, 2000). Nenhum estudo deste género foi desenvolvido com as raças portuguesas, também elas originárias de zonas endémicas. Estudos envolvendo estas raças deveriam ser realizados com o objectivo de esclarecer se existe por parte de alguma delas algum grau de resistência ao parasita (Pinhão, 2009). Por outro lado, as raças puras parecem ser mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença do que animais cruzados (Doctoral & Simó, 2009).

5. Análise geospacial de dados

Geoprocessamento é uma área do conhecimento denominada oficialmente de geomática e engloba um conjunto de técnicas das quais se destacam os sistemas de informação geográfica (SIG). Estes sistemas caracterizam-se por constituírem um interface de hardware, software e procedimentos computacionais que analisam e processam a informação espacial obtida por satélite e outras fontes (Athán et al., 2009).

Durante estes últimos anos, esta área tem despertado interesse entre os epidemiologistas, por ser uma ferramenta útil na área de investigação e saúde pública

A epidemiologia espacial abrange a análise geoespacial de determinada doença, sendo necessária a formulação de modelos matemáticos para descrever a relação entre os factores que influenciam a doença e a sua respectiva distribuição geográfica. Neste sentido, a sua aplicabilidade centra-se em funções como vigilância e monitorização de doenças, identificação de áreas e/ou populações em risco e implementação de planos de acção prevendo o impacto de determinada doença (Pina & Olhero, 2004).

5.1. Georeferenciação

A georeferenciação é, quase invariavelmente, a etapa inicial do processo de análise espacial de dados. Consiste numa operação que permite localizar e representar na superfície terrestre, através de uma projecção cartográfica pré-definida, atributos de dados processados e armazenados por SIG (Pina & Olhero, 2004).

Para a georeferenciação, foi necessária uma preparação prévia da base de dados obtida, através dos inquéritos efectuados, em que cada amostra de sangue correspondeu a uma localização geográfica e código específico (anexo 7). Para este efeito foi utilizado o programa Open Office 3, que de resto, serviu para trabalhar e guardar dados em formato compatível com outros softwares (extensão cvs).

A construção de mapas com pontos georreferenciados foi efectuada com recurso ao programa “Quantum GIS, version 1.6.0 copiápó”. A georeferenciação foi realizada em duas fases: a primeira, semi-automática, consistiu na utilização da funcionalidade “geocoding” do QGIS para

localizar e assinalar cada morada ou localidade no mapa; a segunda fase consistiu numa georeferenciação manual dos registos não georeferenciados na primeira fase, por não serem identificadas no mapa digital as localizações pretendidas.

As projecções cartográficas utilizadas para a construção dos mapas representados foram as WGS 84, EPSG 4326 e a Goolge Mercator, EPSG 900913.

5.2. Análise de agregados espaciais

A análise de agregados espaciais (*clusters*), permitiu detectar regiões geográficas cujo risco de existir doença é consideravelmente maior do que nas restantes áreas em estudo (Lucena & Moraes, 2009; Kulldorff, 2010).

Esta técnica permitiu testar se os casos de leishmaniose são aleatoriamente distribuídos no espaço e conhecer em cada *cluster* espacial definido, o número total de casos, o número de casos positivos e o número de casos positivos esperado, permitindo ainda calcular o risco relativo e avaliar a significância estatística.

Dentro dos métodos de detecção de *clusters*, aplicou-se o método Scan com recurso ao software SaT Scan v9.1. Esta metodologia foi aplicada a dados exclusivamente espaciais, tendo como modelo de probabilidade, o modelo de Bernoulli. A componente teórica do método estatístico Scan, utilizada como fundamento de base, foi descrita por Kulldorff e Nagarwalla (Kulldorff, 1997). O método permite identificar aglomerados (regiões circulares) ao qual é associado o valor da função de verosimilhança e um valor de p referente a simulação de Monte Carlo (Costa & Assunção, 2006; Kulldorff, 2010).

As coordenadas dos centróides obtidas, permitiram projectar áreas circulares com um raio definido. Contudo, visto que o output do SaT Scan não apresenta os resultados em mapas, os resultados foram importados para o programa “Quantum GIS 1.6.0 copiapó” para a elaboração dos mesmos.

5.3. Análise de factores de risco

A análise de factores de risco teve como objectivo detectar classes de ocupação e/ou uso de solo que pudessem explicar a distribuição geoespacial de leishmaniose.

Para detectar esses tipos de ocupação de solo foi necessário definir a área territorial média de cada cão através de uma área circular com raio estabelecido. A construção de *buffers* permitiu definir essa área de influência e visualizar através de mapas a área relativa aos animais que foram georeferenciados. Em segundo lugar, a individualização de cada classe de ocupação de solo pertencente ao mapa CLC2006, objectivou obter os valores médios das fracções de áreas de cada tipo de ocupação de solo que se encontravam englobados nos *buffers*, em função dos casos seropositivos e seronegativos.

5.3.1. Mapas com *buffers*

O raio definido para a construção de *buffers* permitiu estabelecer uma área territorial média “homerange” para cada cão e baseou-se em quatro aspectos fundamentais:

Tipo de declive (ligeiramente acentuado) e o tipo de relevo (constituído por vales e outeiros) existentes na área geográfica do estudo, uma vez que está descrito que, quanto mais acidentado for o terreno, menor a área territorial do cão, pois o afastamento do cão é condicionado pela dispersão das feromonas no espaço.

Tipo de actividade e hábitos de vida que a maioria dos cães apresentava. Constatou-se que a maioria destes animais possuía uma área de referência onde comia, dormia e passava a maior parte do tempo. Todavia, como não estavam limitados a uma área fixa (presos por corrente ou em canis), podiam deambular pelas ruas e localidades vizinhas. Estudos indicam que um cão pode movimentar-se consoante a sua actividade e hábito de vida, entre os 260 metros (para um cão sedentário) e os 8-30 quilómetros (Meek, 1999).

Outro factor a considerar é a área média de dispersão do flebótomo, que segundo alguns autores pode atingir os 1000 metros (Afonso & Alves-Pires, 2008).

O assunto debatido com um profissional na área de comportamento animal e os aspectos acima mencionados permitiram definir os *buffers* com um raio de 1500 metros.

A construção do mapa com áreas circulares a partir de pontos georeferenciados foi executada com recurso ao programa Quantum GIS, version 1.6.0 copiapó.

5.3.2. Caracterização da ocupação de solo

De modo a caracterizar a área de influência, ou seja, o habitat dos cães em função da ocupação de solo recorreu-se aos dados do programa CORINE.

O Programa CORINE (*Co-ordination of Information on the Environment*) foi criado pela Comunidade Europeia com o objectivo de desenvolver um sistema de informação sobre o estado do ambiente a nível europeu. Uma das principais componentes deste programa foi o projecto CORINE Land Cover (CLC), que teve como objectivo primordial a produção de mapas de ocupação e/ou uso de solo para os países da União Europeia. Esta base de dados ficou conhecida como CORINE Land Cover.

A variabilidade da ocupação de solo existente em Portugal Continental (mapa CLC90) constituiu uma dificuldade na sua correcta identificação, só minimizada com uma compreensão de todas as classes existentes (Caetano *et al.*, 2007). O anexo 6 apresenta a nomenclatura do CLC2006, onde estão incluídas 49 classes de ocupação de solo. A cartografia respectiva possui uma exactidão geométrica inferior a 100 metros.

Para a produção da cartografia CLC2006 foram usados como dados de referência as imagens de satélite SPOT 4, SPOT 5 e LIS III fornecidas pela ESA em acordo com instituições detentoras dos satélites (Caetano *et al.*, 2007)

Para análise da informação geoespacial respeitante ao CLC2006, na individualização de cada classe de ocupação de solo, usou-se o software gvSIG 1.10 OADE (Oxford Archaeology Digital Edition) 2010 com extensão GRASS 6 e o conjunto de ferramentas do Sextante versão 0.6. O tratamento dos dados obtidos, para obter factores de risco, foi efectuado através da função “sample t-test” com recurso ao programa R version 2.12.2.

6. Resultados

6.1. Georeferenciação & Localização

Nos mapas seguintes, apenas foram georreferenciadas as localizações de proveniência dos cães com dono (262 pontos georreferenciados).

A Figura 38 demonstra qual a localização geográfica e espacial da área em estudo relativamente à área continental (Portugal).

As diferentes cores representam os três concelhos: Mação (laranja); Proença-a-Nova (azul) e Vila de Rei (verde). As freguesias estão delimitadas por traço preto.

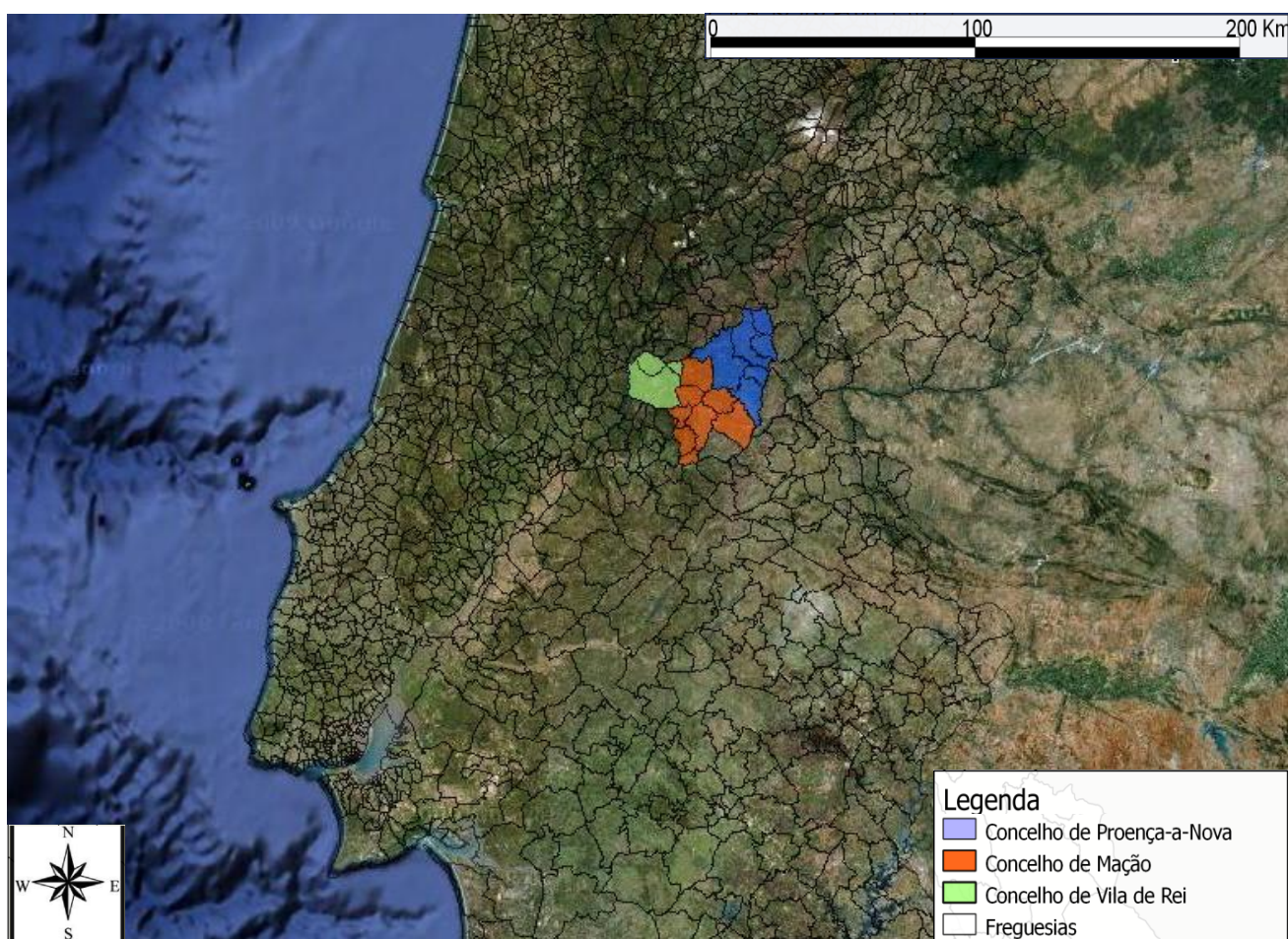


Figura 38 – Mapa de localização geoespacial da área em estudo

Os pontos georreferenciados respeitantes às localizações dos cães do concelho de Vila de Rei foram representados com a cor verde, os do concelho de Mação com a cor laranja e os do concelho de Proença-a-Nova com a cor azul. As áreas dos concelhos estão representadas com as mesmas cores (Figura 39).

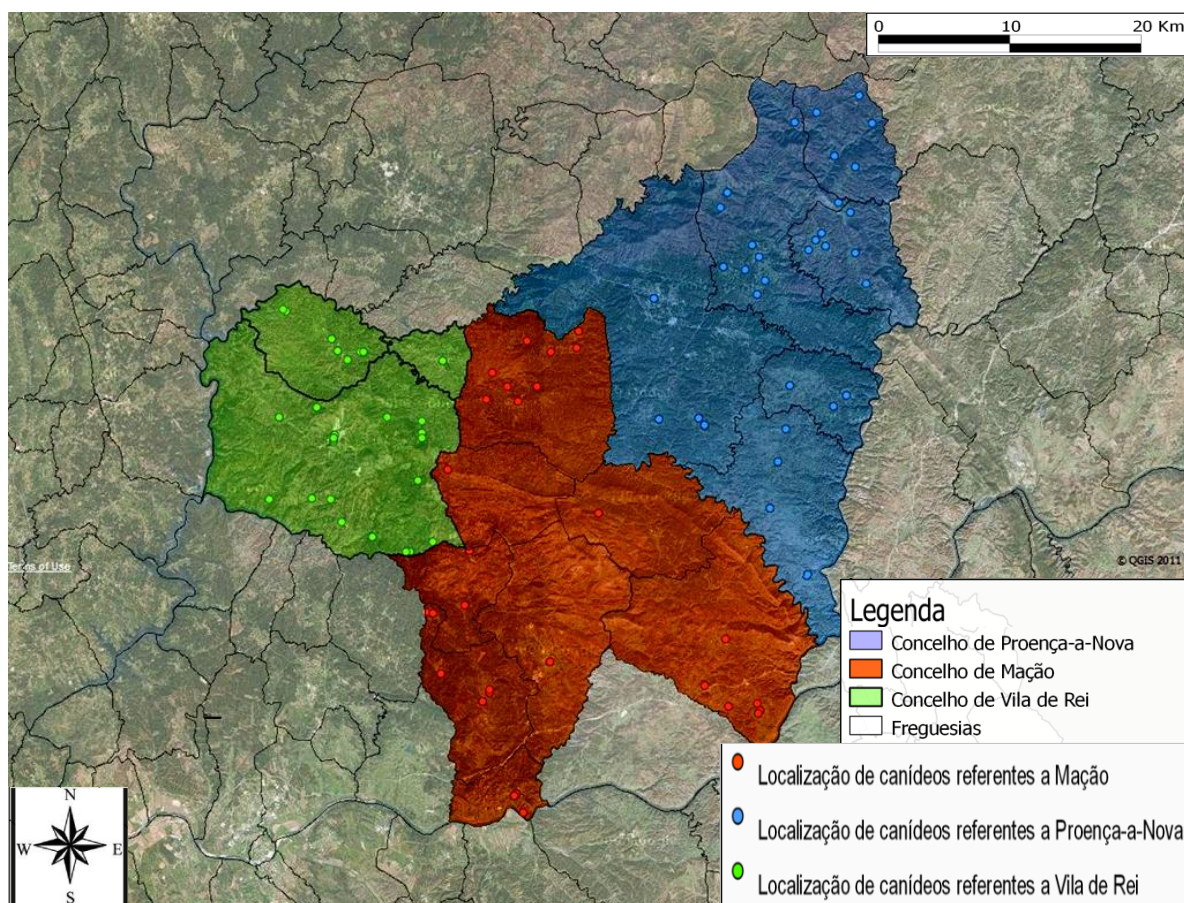


Figura 39 – Mapa de Georeferenciação

6.2. Mapa de seroprevalências

A Figura 40 representa um mapa organizado por classes. Cada uma engloba um intervalo de valores de seroprevalência e corresponde a uma cor específica. De acordo com os resultados obtidos relativamente às seroprevalências pela presença de anticorpos de anti-*Leishmania*, foi atribuído a cada freguesia uma categoria.

Pode-se observar que as freguesias de Amêndoa, Carvoeiro, Peral, Aboboreira, Mação, Ortiga e Envendos pertencem à classe representada com a cor azul, ou seja, com os menores valores de seroprevalência observados (0-14%), enquanto as freguesias de São João do Peso e Fundada pertencem à classe representada com a cor vermelho, onde se observam os maiores valores de seroprevalência (76-100%).

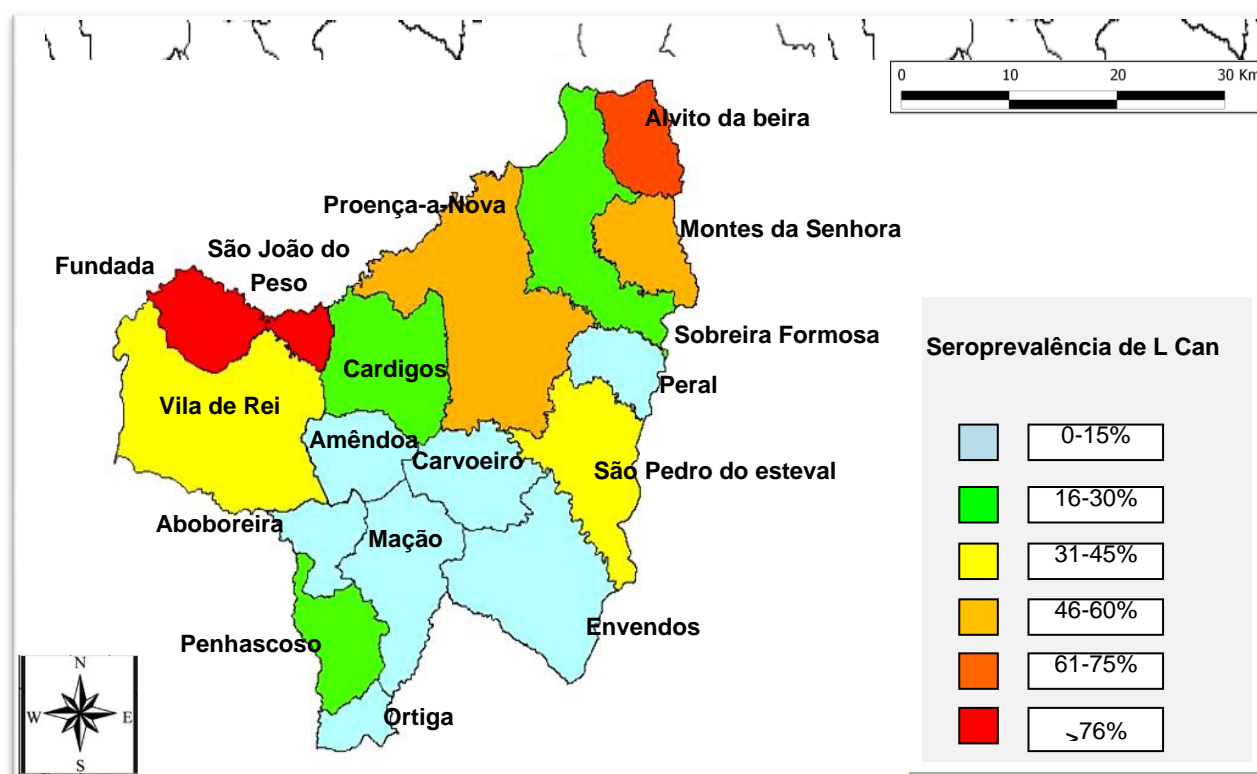


Figura 40 – Mapa de Seroprevalência de leishmaniose por freguesia

6.3. Análise de agregados espaciais

Através da base de dados constituída por um conjunto de coordenadas espaciais completando um total de 89 centróides, em que cada centróide representa uma localidade ou morada, foram definidos dois *clusters*. Podemos observar, na tabela 17, as características respectivas de cada *cluster*. No *cluster* 1, o aglomerado envolveu uma população de 36 cães, dos quais 23 foram seropositivos. Neste aglomerado apenas eram esperados cerca de 11,3 casos seropositivos, o que significa que um cão, pertencente a este *cluster*, tem um risco relativo 2.45 vezes superior de ser seropositivo, relativamente a uma área fora dos *clusters*. O valor de *p* obtido foi 0.003. No *cluster* 2, o aglomerado envolveu uma população de 12 cães, dos quais 10 foram seropositivos. Neste aglomerado apenas eram esperados cerca de 4 casos seropositivos, o que significa que um cão, pertencente a este *cluster*, tem um risco relativo 2.89 vezes superior de ser seropositivo, relativamente a uma área fora dos *clusters*. O valor de *p* obtido foi 0.027.

Tabela 17 – Caracterização dos *clusters*

	Cluster 1	Cluster 2
Código (ID`s)	131014; 12201; 124012; 121013; 120017; 114132; 110109; 32153; 127011; 30158; 123201; 129023; 26113; 107126; 132055; 134124; 137103; 138148; 111111	157506; 152353
Coordenadas (cartesianos)	-905802,4824890	-881816,4820310
Raio (metros)	10809	3051
População	36	12
Número de casos observados	23	10
Número de casos esperados	11,3	3,8
Casos observados / casos esperados	2,04	2,66
Risco relativo	2,45	2,89
Logaritmo de verosimilhança	9,52	7,33
p- value	0,003	0,027

As coordenadas dos centróides referentes aos *clusters* permitiram projectar áreas circulares com raio definido: o *cluster 1* (cor violeta) com as coordenadas, -905802, 4824890 e raio 10.809 metros, cujo centróide se situa no concelho de Vila de Rei, e o *cluster 2* (cor amarela) com as coordenadas -881816, 4820310 e raio 3.051 metros, cujo centróide se situa na freguesia de Proença-a-Nova (Figura 41). Os pontos vermelhos representam os cães seropositivos e os pontos azuis representam os seronegativos.

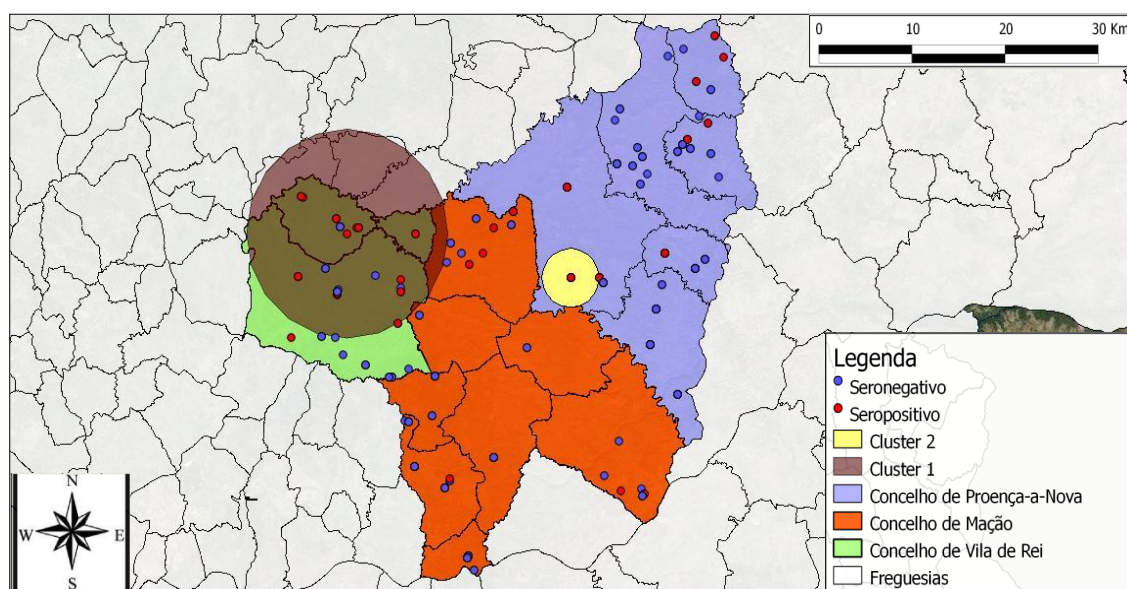


Figura 41 – Mapa de representação geospacial de *clusters*

6.4. Análise de factores de risco

6.4.1. Buffers

A Figura 42 define cada *buffer* com um raio de 1500 metros e uma área correspondente de 7,7 Km².

As diferentes opacidades dos *buffers* representam as diferentes quantidades de casos por cada ponto georeferenciado, sendo mais opaco quantos mais casos descritos nessa localização. Existem no total 89 localizações diferentes representadas no mapa.

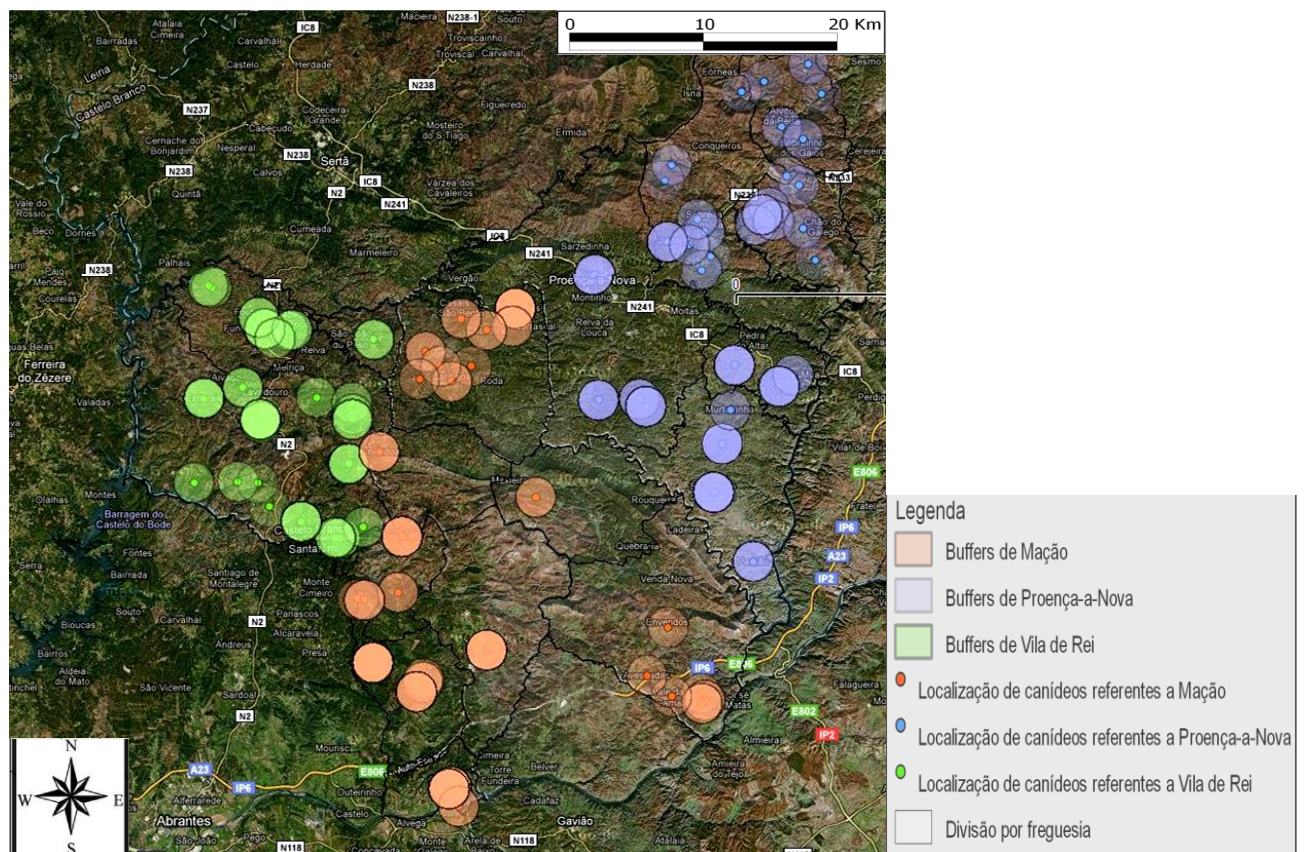


Figura 42 – Mapa de Buffers

6.4.2. Caracterização da ocupação de solo

Verificou-se que, dos 49 tipos de ocupação de solo, foram detectados 16 classes na área pertencente ao estudo, sendo que apenas 5 apresentavam possível influência na distribuição geográfica de leishmaniose, com um nível de 95% de confiança.

Na tabela 18 podemos observar os diferentes tipos de ocupação de solo e os valores das fracções das áreas que estão englobadas nos *buffers*. A média da área de determinado tipo de ocupação de solo em função do grupo seronegativo ou seropositivo pode ser calculada a partir

da fórmula: $(\pi r^2) * f$, em que π é o valor de Pi, r o valor do raio (1,5 Km) e f corresponde ao valor médio da fracção (%) da área dos *buffers*.

Podemos observar que a média da área de ocupação de solo por culturas temporárias de regadio, olivais, sistemas culturais e parcelares complexos e cursos de água apresentam diferenças estatisticamente significativas entre os casos seropositivos e os seronegativos, $p = 0,026$; $p = 0,013$; $p = 0,021$; $p = 0,012$, respectivamente.

Constata-se que o grupo seronegativo apresenta uma área média maior que o grupo seropositivo.

Em relação à média da área de ocupação de solo por florestas abertas, cortes e novas plantações, entre os casos seropositivos e os seronegativos observa-se a existência de diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,043$).

O grupo seropositivo apresenta uma área média maior que o grupo seronegativo.

Tabela 18 – Análise de factores de risco por tipos de ocupação de solo I

	Valor médio da fracção (%)	Média da área (Km ²)	Desvio padrão	Número de casos	Valor de p
Culturas temporárias de regadio					
Grupo seronegativo	0,0046	0,1195	0,0163	182	0,026
Grupo seropositivo	0,0012	0,0184	0,0078	82	
Olivais					
Grupo seronegativo	0,0169	0,0368	0,0736	182	0,013
Grupo seropositivo	0,0026	0,0085	0,0141	82	
Sistemas culturais e parcelares complexos					
Grupo seronegativo	0,1469	1,0383	0,1326	182	0,021
Grupo seropositivo	0,1044	0,7379	0,1387	82	
Florestas abertas, cortes e novas plantações					
Grupo seronegativo	0,3629	2,5650	0,2762	182	0,043
Grupo seropositivo	0,4448	3,1439	0,3114	82	
Cursos de água					
Grupo seronegativo	0,0052	0,0325	0,0174	182	0,012
Grupo seropositivo	0,0012	0,0085	0,0078	82	

Na tabela 19 podemos observar que não existem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as médias das áreas nos diversos tipos de ocupação de solo, segundo o grupo seropositivo e seronegativo.

Tabela 19 – Análise de factores de risco por tipos de ocupação de solo II

	Valor médio da fracção (%)	Média da área (Km ²)	Desvio padrão	Número de casos	Valor de <i>p</i>
Planos de água					
Grupo seronegativo	0,0008	0,0057	0,0064	182	0,216
Grupo seropositivo	0,0024	0,0170	0,0108	82	
Áreas ardidas					
Grupo seronegativo	0,0060	0,0424	0,0174	182	0,902
Grupo seropositivo	0,0054	0,0382	0,0078	82	
Florestas mistas					
Grupo seronegativo	0,0368	0,2601	0,1160	182	0,856
Grupo seropositivo	0,0342	0,2417	0,1087	82	
Florestas de resinosas					
Grupo seronegativo	0,1573	1,1118	0,1771	182	0,234
Grupo seropositivo	0,1904	1,3457	0,2202	82	
Florestas de folhosas					
Grupo seronegativo	0,0206	0,1456	0,0628	182	0,568
Grupo seropositivo	0,0166	0,1173	0,0511	82	
Agricultura com espaços naturais e semi-naturais					
Grupo seronegativo	0,1611	1,1387	0,1560	182	0,186
Grupo seropositivo	0,1369	0,9676	0,1279	82	
Culturas temporárias e/ou pastagens associadas a culturas permanentes					
Grupo seronegativo	0,0111	0,0785	0,0318	182	0,072
Grupo seropositivo	0,0229	0,1619	0,0542	82	
Pomares					
Grupo seronegativo	0,0008	0,0057	0,0074	182	0,158
Grupo seropositivo	0,0000	0,0000	0,0000	82	
Culturas temporárias de sequeiro					
Grupo seronegativo	0,0330	0,2332	0,1512	182	0,124
Grupo seropositivo	0,0102	0,0721	0,0863	82	
Tecido urbano descontínuo					
Grupo seronegativo	0,0322	0,2276	0,0439	182	0,139
Grupo seropositivo	0,0240	0,1696	0,0398	82	
Indústria, comércio e equipamentos gerais					
Grupo seronegativo	0,0040	0,0283	0,0150	182	0,448
Grupo seropositivo	0,0027	0,0191	0,0120	82	

7. Discussão

Observa-se através da Figura 38, que o presente estudo sero - epidemiológico de leishmaniose canina abrange uma área nacional considerável. Com 677,1Km² a área geográfica do estudo engloba o ponto geodésico de Portugal. No entanto, a vantagem de adquirir informação relativa aos três concelhos é contraposta pelo menor número de amostras de sangue recolhidas por concelho.

A Figura 39 reflecte a distribuição geoespacial das localizações dos pontos georeferenciados. Denota-se que estes estão influenciados e coincidem, em última análise, pela distribuição geoespacial das localidades ou freguesias de onde os animais provêm. Os pontos georreferenciados distribuíram-se, de modo geral, de forma proporcional e equitativa por todos os concelhos pertencentes ao estudo, de acordo com o número de cães que se apresentavam à campanha de vacinação anti - rábica.

O mapa da Figura 40 foi construído com base nas seroprevalências obtidas pela presença de anticorpos anti - *Leishmania* nas freguesias respectivas aos três concelhos, e elucida o carácter endémico da região, conforme descrito por outros autores (Branca *et al.*, 2009; Silva, 2009). No entanto, são necessários mais estudos que envolvam um maior número de cães, com a finalidade de obter informação o mais pormenorizada possível. Esta necessidade deve-se principalmente à não existência de qualquer estudo, até então, por amostragem ou censo, a canídeos em 9 das 17 freguesias estudadas. Por outro lado, para confirmar que o ciclo de transmissão se complete nesta região, é fundamental a realização de trabalhos que concluam a existência de flebotomos capturados com infecção por *Leishmania infantum*, e que a capacidade infectante destes vectores para os hospedeiros vertebrados seja comprovada. A abordagem utilizada para análise de *cluster* objectivava a identificação de aglomerados em regiões não muito distintas dos locais onde se evidenciaram os casos seropositivos, definindo áreas com maior risco relativo de um cão ter leishmaniose. O mapa da Figura 41 representa dois *clusters*: o *cluster* 1, com maior área, engloba as freguesias de São João do Peso, Fundada e região norte de Vila de Rei, todas pertencentes ao concelho de Vila de Rei e abrange ainda, mais três freguesias, que não fazem parte do estudo e que pertencem ao concelho da Sertã (Palhais, Cumeada e Marmeleiro); o *cluster* 2 apenas engloba a região sul da freguesia de Proença-a-Nova. Podemos afirmar, de acordo com o nosso estudo, que os cães pertencentes aos *clusters* 1 e 2 apresentam um risco relativo maior de serem seropositivos por infecção de *Leishmania* de 2,45 e 2,89, respectivamente, em relação a áreas fora dos *clusters*.

Relativamente à análise de factores de risco, a construção de mapas com *buffers* (Figura 42) permitiu definir a área média territorial de cada cão. Devido aos parâmetros acima descritos foi definido, neste estudo, um raio de 1500 metros. À semelhança, num estudo efectuado tendo como finalidade explicar a distribuição geoespacial de leishmaniose, construindo mapas de risco, definiram um raio de 1000 metros para cada *buffer* (Aparicio & Bitencourt, 2004).

Constata-se que, se os *buffers* fossem definidos com base apenas na área de dispersão de flebótomos, a informação obtida seria mais específica, uma vez que a área de influência seria menor. Por outro lado, não se considerava a dinâmica das movimentações que ocorrem nas populações de cães da região, fundamentais para a caracterização da ocupação de solo segundo o habitat dos cães.

A análise da informação geoespacial referente à ocupação e/ou uso de solos permite inferir quais os tipos de ocupação de solo susceptíveis de estar relacionados com a seronegatividade ou seropositividade pela presença de anticorpos anti - *Leishmania*. No entanto, é preciso referir que a distribuição geoespacial de leishmaniose está influenciada por outras condicionantes, sendo necessária, para a discussão de resultados, uma perspectiva holística dos factores envolvidos.

Sabe-se, por exemplo, que os biótopos com presença de troncos ocos de árvores e matéria orgânica no solo podem servir de locais de abrigo e/ou criação para os dípteros. Sabe-se também, que outros factores, como o uso de coleira protectora contra a picada de vectores, podem influenciar ou condicionar os resultados da distribuição geoespacial de leishmaniose. (Saraiva, 2008).

No que diz respeito à análise dos factores de risco relativos à ocupação do solo destaca-se o resultado obtido referente ao tipo de ocupação de solo por florestas abertas, cortes e novas plantações. Este tipo de ocupação de solo caracteriza-se pormenorizadamente por áreas de matos e/ou pastagens naturais com árvores dispersas (cujo limite inferior de existência é 10%), bem como floresta degradada ou em regeneração (Caetano *et al.*, 2007).

Podemos referir que foram registadas diferenças estatisticamente significativas entre a média das áreas, comparando o grupo de casos seropositivos e os seronegativos, o que indica que este tipo de ocupação de solo se pode correlacionar com o maior número de casos seropositivos, provavelmente devido à maior densidade vectorial.

Este resultado está de acordo com outros autores que também correlacionam este tipo de ocupação de solo com a maior seropositividade encontrada (Aparicio & Bitencourt, 2004).

Em relação à ocupação de solo por cursos e planos de água, alguns autores, em estudos de análise geoespacial referem que não existe correlação entre os cursos de água a céu aberto e a ocorrência de casos de leishmaniose. O resultado obtido no presente estudo deve ser interpretado da mesma forma (Aparicio & Bitencourt, 2004).

Em relação à ocupação de solo por olivais, sistemas culturais, parcelares complexos e por culturas temporárias de regadio, embora se tenha verificado que existe diferença estatisticamente significativa, os resultados obtidos direccionam a relação destes tipos de ocupação de solo com o grupo seronegativo, pois as médias das áreas nestes grupos são maiores comparativamente ao grupo seropositivo, pelo que aparentemente esta correlação não constitui relevância.

Verificou-se ainda neste estudo, relativamente à análise de factores de risco por ocupação de solo, que o tecido urbano (tecido urbano descontínuo e áreas de indústria e comércio) e as áreas agrícolas (culturas temporárias; culturas permanentes e áreas agrícolas heterogéneas) não apresentam correlação com os casos seropositivos ou seronegativos.

Também alguns autores referem não existir, aparentemente, correlação entre os casos seropositivos e estes tipos de ocupação de solo (Saraiva, 2008).

Sabe-se que, tanto se trate de uma escala regional ou local, os modelos espaciais e temporais das distribuições das populações de flebotomos são influenciados pela humidade, temperatura, luminosidade e altimetria. Ao contemplar a análise do CLC por ocupação de solo de vegetação efectua-se indirectamente a análise de todos os parâmetros acima descritos (Aparicio & Bitencourt, 2004; Saraiva, 2008).

Estudos de análise geoespacial efectuados no Brasil verificaram que a vegetação constitui um tipo de ocupação de solo com forte relação na distribuição dos casos seropositivos por infecção de *Leishmania* (Aparicio & Bitencourt, 2004; Saraiva, 2008). No presente estudo, não foi assinalada nenhuma área com este tipo de ocupação de solo.

No entanto, a nomenclatura dos tipos de ocupação de solo adaptada a Portugal refere que as classes por áreas de pastagens naturais com vegetação herbácea, essencialmente gramíneas, sem intervenção humana e as áreas de vegetação natural com espécies arbustivas, se apresentaram confusas e algo controversas, a partir da imagem por satélite, levantando problemas na sua identificação rigorosa, aplicando-se critérios como a alímetria e os diferentes tipos de clima para sustentar a repartição e a escolha das imagens obtidas por satélite nas diferentes classes (Caetano *et al.*, 2007). Podemos referir que a diferença de resultados com outros autores, relativamente à relação das classes de ocupação de solo por vegetação e os casos seropositivos por presença de anticorpos anti – *Leishmania* podem ser explicadas devido aos diferentes ajustes da nomenclatura dos tipos ocupação de solo e/ou pelas características edafo-climáticas da sub-região do Pinhal Interior Sul.

8. Conclusão

A componente teórica e prática necessária à realização do presente estudo, permitiu ao autor obter novos conhecimentos nas diversas áreas implícitas. O trabalho de campo, laboratório, os softwares, operações e ferramentas utilizadas, constituíram-se fundamentais na aquisição de capacidades para a elaboração futura de outros trabalhos quer no ramo da investigação, quer na melhor compreensão da actividade clínica que desenvolva.

Os resultados de seropositividade por presença de anticorpos anti-*Leishmania* evidenciaram a alta sensibilidade obtida pelo protocolo utilizado na técnica de ELISA, asseverando a utilização desta técnica em estudos epidemiológicos sobre leishmaniose canina.

O estudo sero-epidemiológico de leishmaniose canina, só possível com a cooperação de todos os colaboradores, permitiu determinar e avaliar os níveis de seroprevalência na sub-região do Pinhal Interior Sul, inferindo que foram detectados anticorpos anti-*Leishmania* na população de cães pertencentes ao estudo.

Com base nos valores obtidos, reafirmou-se o carácter endémico no concelho de Mação, como referido por outros autores e documentou-se, pela primeira vez, valores de seroprevalência nos concelhos de Proença-a-Nova e Vila de Rei. Concluiu-se que, estes dois últimos concelhos apresentaram valores de seroprevalência elevados, comparativamente a outras regiões descritas na bibliografia, considerando-se que os seus cães apresentavam maior probabilidade de estar seropositivos, comparativamente a Mação.

Foi documentado, de acordo com os parâmetros analisados, que a idade constituiu um factor de risco na população de cães.

Através dos sistemas de informação geográfica demonstrou-se a distribuição geoespacial da seroprevalência de leishmaniose nos três concelhos, concluindo que existem duas regiões com maior risco relativo de um canídeo apresentar leishmaniose. Uma região engloba-se na zona norte do concelho de Vila de Rei e sul do concelho da Sertã, e outra no sul da freguesia de Proença-a-Nova.

Quando caracterizadas as áreas de influência dos cães (*buffers*) através dos diversos tipos de ocupação de solo, evidencia-se que as florestas abertas, cortes e novas plantações podem constituir uma classe de ocupação de solo com influência na distribuição geográfica de leishmaniose, uma vez que foi encontrada relação entre os casos seropositivos e esta variável. Os parâmetros analisados, bem como a pesquisa e recolha bibliográfica, permitiu concluir a importância da leishmaniose na população de cães na sub-região do Pinhal Interior Sul e prever o seu impacto negativo na saúde pública. O acompanhamento, aquando do período de estágio, de uma criança com leishmaniose visceral humana, no concelho de Proença-a-Nova, junto do Médico Veterinário responsável, cuja função objectivava inventariar o caso, tornou evidente a necessidade de agir no sentido de minimizar o impacto desta doença na saúde pública.

A informação decorrente do presente estudo irá fundamentar o requerimento de um plano de acção, junto da Direcção Geral de Veterinária, no sentido de encetar estratégias e actuações visando o combate à leishmaniose.

9. Bibliografia

- Abrantes, P. & Silveira, H. (2009). Alterações climáticas na Europa: Efeito nas doenças parasitárias humanas. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*. Vol. 27, nº 2, pp. 71-86
- Adamama-Moraitou, K.K., Saridomichelakis M.N., Polizopoulou, Z., Kritsepi, M., Tsompanakou, A., Koutinas, A.F. (2005). Short-term exogenous glucocorticosteroidal effect on iron and copper status in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *The Canadian Journal of Veterinary Research*. Vol 69, pp. 287–292
- Afonso, M. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., 2008, pp. 27-40
- Aga, E., Katschinski, D. M., Zandbergen, G.V., Laufs, H., Hansen, B., Müller, K. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*. Nº 169, pp. 898-905.
- Alexandre-Pires, G., Villade, M.T., Algueró. C., Catarina, M., Rodrigues, O. R., Fonseca, I.P. (2010). Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, pp. 0-9
- Allenbach, C., Zufferey, C., Perez, C., Pascal., Mueller, C., and Fabienne. (2006). Macrophages Induce Neutrophil Apoptosis through Membrane TNF, a Process Amplified by *Leishmania major*, *The Journal of Immunology*. Vol 176, pp. 6656-6664
- Almeida, M., Vilhena, V., Barral, A., Barral-Netto, M. (2003). *Leishmania* Infection: Analysis of its First Steps. Vol. 98, nº 7, pp. 861-870.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Boer, M., Dedet, G., Rogelio., Moreno, J. (2008). The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 21, nº 2, pp. 334–359
- Amóra, S., Bevilaqua, C., Feijó, F., Alves, N. & Maciel M. (2009). Control of phlebotomine (Diptera: *Psychodidae*) leishmaniasis vectors. *Neotropical. entomology*. Vol. 38, nº3, pp. 303-310
- Andrade, A., Queiros, L., Nunes, G., Perri, P., Maroni, N. (2007). Dog replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 40, 5, pp. 594-595.

- Andrade, C., Kido, É., Luna, L., Melo, M., Andrade, P., Balbino, V. (2006). Manual on-line Leishmanioses. Centro de ciências biológicas. Universidade de Pernambuco. Disponível em: http://www.ufpe.br/biolmol/Leishmanioses-Apostila_on_line/index.htm
- Aparicio, C & Bitencourt, D. (2004). Spacial modeling of Cutaneous Leishmaniasis risk zones. *Revista Saúde Pública*. Vol. 38, nº. 4, pp. 511-516
- Apifarma. (2007). Simposium veterinário, pp. 410
- Aragón, E., Gómez, F., Lasheras, M., Barbas, F. (sd). Leishmaniosis canina y Humana: una visión de conjunto. Sección de Epidemiología. Instituto de Salud Pública. Comunidad de Madrid, pp. 28-33
- Athan, T., Dassau. O., Dobias, M., Ghisla, A., Holl, S., Hugentobler, M., Homann, M. (2009). Quantum GIS. User Guide. Version 1.1.0 'Pan. Disponível em <http://qgis.osgeo.org>.
- Balley, H. & bishop, W. J. (1959). Leishman-donovan bodies and donovaniasis Sir William boog leishman, 1865-1926, sir charles donovan, 1863-1951, *brit. j. vener. dis*, 35, 8.
- Baneth, G. (2002). A review of the treatment of canine leishmaniasis. R. Killick-Kendrick. Canine Leishmaniasis: Moving towards a solution, pp. 15-21
- Baneth, G., & Aroch. L. (2008). Canine leishmaniasis. A diagnostic and clinical challenge. *The Veterinary Journal*, 175, pp. 14 –15
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Gallego, L. S., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* , 24, pp. 324-330.
- Barrientos, M. M., Gongora, A. Torres, E. M., Miró, C. G. (sd). Leishmaniosis canina e felina: tratamento. Departamento de Sanidad Animal. Universidad Complutense de Madrid, pp. 72-86
- Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37, pp. 1097–1106
- Beck, A., Beck, R., Kusak, J., Gudan, A. Martinkovic, F., Artukovic, B (2008). A Case of Visceral Leishmaniosis in a Gray Wolf (*Canis lupus*) from Croatia. *Journal of Wildlife Diseases*. Vol. 44, 2, pp. 451–456

- Ben-Ahmed, K., Aoun, K., Jeddi, F., Ghrab, J. (2009). Visceral Leishmaniasis in Tunisia: Spatial Distribution and association with Climatic Factors. *Journal Tropical Medicine*. Vol, 81, 1, pp. 40–45
- Besteiro, S., Tonn, D., Tetley, L., Coombs, G. H., (2008) AP3 adaptor is involved in the transport of membrane proteins to acidocalcisomes of *Leishmania*. *Journal of Cell Science* 121, pp. 561-570
- Bhattacharjee, S., Gupta, G., Bhattacharya, P., Mukherjee, A., Bhattacharyya, S., Amita-Pal, M (2009). Quassin alters the immunological patterns of murine macrophages through generation of nitric oxide to exert antileishmanial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol 63, pp. 317–324.
- Bourdeu, P. (1983). Éléments pratiques du diagnóstico de la leishmaniosis canine. *Le point Vét.* Vol.15, 72, pp. 43-50.
- Branca, H., Matos, A.C., Monteiro, F., Martins, M., Cardoso, L. (2009). Estudo sero-epidemiológico da leishmaniose canina no concelho de Mação - Resultados preliminares. VI Congresso da Ordem dos Médicos Veterinários.
- Branchelente, C. & Welle. (2005) N. Cutaneous Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs is Associated with a T Helper-2–biased Immune Response. *Veterinary Pathology*, Vol 42, pp. 166–175
- Caetano, M., Nunes V., Nunes, A. (2007). Portugal CORINE Land Cover 2006: Manual de apoio à produção do CLC2006 para Portugal Continental. Versão 2.5.
- Camargo, M. A & Basano, S. A. (2004) American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Revista Brasileira De Epidemiologia*. Vol. 7,nº 3, pp. 329-337
- Campillo, M.C., Vazquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romerom H.Q., Varela, M.C. (1999). *Parasitología Veterinaria*. 1ª eds, pp.651-665. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Campino, L & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa*. Vol. 23, 5, pp. 859-864
- Campino, L. (2002). Canine reservoirs and leishmaniasis: epidemiology and disease. *World Class Parasites*. Kluwer Academic Publishers. Vol. 4, pp. 45-57

- Campino, L., Cardoso, L., Villa de Brito, T., Carvalho, L., & Neves, R. (2010a). Vector. Obtido em 2010 de onleish- Observatório Nacional das leishmanioses: <http://www.onleish.org/index.php?article=24&visual=3>
- Campino, L., Cardoso, L., Villa de Brito, T., Carvalho, L., & Neves, R. (2010b). *Epidemiologia da Leishmaniose Canina*. Obtido em 2010 de Onleish – Observatório Nacional das Leishmanioses: <http://www.onleish.org/index.php?article=9&visual=3>
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J., Gomes, G., Pires, C.(2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*, 11, pp. 1708-1714.
- Cardoso, L. (2004). Estudos de infecção canina por *Leishmania* no Alto Douro. Tese de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Veterinárias.
- Cardoso, L. (2009). Dogs, arthropod-transmitted pathogens and zoonotic diseases. *Trends in Parasitology*. Vol. 26, nº 2, pp. 61-62
- Cardoso, L., Santos, H., Silva, A. C., Pratlong, F., Dedet, J. P., & Rodrigues, M. (2002). *Leishmania infantum* Mon-98: infection in a dog from Alto Douro. *Acta Tropica*, 83, pp. 83-85.
- Cascio, A., Martino, Paolo- Occorsio, L., Giacchino, R., Catania, S., Gigliotti, A., Aiassa, C. A. (2004). 6 day course of liposomal amphotericin B in the treatment of infantile visceral leishmaniasis: the Italian experience *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol 54, pp. 217–220
- Ciaramella, P. & Corona, M. (2003b). Canine leishmaniasis: therapeutic aspects. *Compendium*, 25, pp. 370-375.
- Ciaramella, P., & Corona, M. (2003a). Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium*, 25, pp. 358-359.
- Coelho, S., Cardoso, L., Brancal, H., Martins, M., Matos, A. (2005). Estudo Sero-epidemiológico da Leishmaniose canina na Região da Cova da Beira. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 12, pp. 289-290.
- Coler, R & Reed G. (2005). Second-generation vaccines against leishmaniasis. *TRENDS in Parasitology*. Vol.21, nº 5.

- Collin, N., Teixeira, R., Regis, G., Lily, C., Laughinghouse, A., Jerrold M. Ward. (2009). Sand Fly Salivary Proteins Induce Strong Cellular Immunity in a Natural Reservoir of Visceral Leishmaniasis with Adverse Consequences for *Leishmania*, *Journal PloS Pathog.* Vol 5, pp. 5
- Corrales, G.M. & Moreno, R.M. (2006). Leishmaniosis canina: manejo clínico y situación actual en España. Espanha: Química Farmacêutica Bayer, S.A.
- Corrales, M. (2007). Canine leishmaniosis: current status in Europe, diagnosis and control. *Acta Scientiae Veterinariae*. Vol 3, pp. 227- 229
- Correia, J.J. & Alexandra-Pires, G. (2008). Capítulo IV: patogenia e Lesões da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.) *Leishmaniose Canina*. Lisboa: ChavesFerreira – Publicações, S.A, pp. 53-69
- Cortes, S., Afonso, M., Pires, C., & Campino, L. (2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 13, pp. 1431-1432.
- Cortes, S., Mauricio, I., Almeida, A., Cristovão J. M., Francine Pratlong., Campino, L (2006) Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology International*, 55, pp. 277–283.
- Costa, M & Assuncao, R. (2006). Uma análise de desempenho dos métodos SCAN na detecção de conglomerados espaciais: Laboratório de Estatística Espacial, departamento de Estatística.
- Costa, M. A., Matheson, C., Iachetta, L. A., Appenzeller, O. (2009). Ancient Leishmaniasis in a Highland Desert of Northern Chile, *journal Ppone*, 4, 9, e0006983
- Costa, M. M. S., Lima, W. G., Figueiredo, M. M., Michalick, M. S. M., Tafuri and, Tafuri, W. L. (2008). Cervical, Mandibular, and Parotid Lymph Nodes of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*: A Histopathologic and Immunohistochemistry Study and Its Correlation with Facial Skin Lesions, *Veterinary Pathology*. Vol, 45, pp. 613–616
- Costa, N., Conceição. M., Werneck. G. (2007). Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol. 40, nº4, pp. 415-419.

- Dantas-Torres, F & Brandão-Filho, S. P. (2006). Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. Vol 39,4, pp. 352-356.
- Dantas-Torres, F. (2006). *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. Readers Opinion and Discussion, 101,1, pp. 117-118
- Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasites & Vectors*. Vol. 2, pp. 1-8.
- Dantas-Torres, F., Brito M. E., Brandão-Filho, S. P. (2006). Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology*. Vol. 140, pp. 54–60
- Dapra, F., Scalone, A., Mignone, W., Ferroglio, E., Mannelli, A., Zanatta, R., Gradoni, L. (2008). Validation of recombinant based antibody ELISA for diagnosis of human and canine leishmaniasis. *Journal immunoassay immunochem*, Vol 96, pp. 839-847.
- Dias, E. L., Batista Z., Calabrese K. S., Lima, B., Abreu-Silva A. L. (2008). Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence, clinical, hematological and biochemical findings of dogs naturally infected in an endemic area of São José de Ribamar municipality, Maranhão state, Brazil. *Ciência Animal Brasileira*. Vol 9, nº 3, pp. 740-745.
- Diniz, S. A., Melo, M. S., Borges, A. M., Bueno, R., Reis, B. P., Tafuri, W. L. (2005). Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Veterinary Pathology*, 42, pp. 650-658.
- Diniz, S. A., Silva, F. L., Carvalho, V., Bueno, R. (2008). Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Developing Countries*. Vol 2, 1, pp. 24-33.
- Dipineto, L., Manna, L., Baiano, A., Gala, M., Fioretti, A., Gravino, A. (2007). Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 43, pp. 518-520.
- Doctoral, T & Simó, F.T. (2009). Vacunación y diagnóstico de la leishmaniosis visceral mediante proteínas recombinantes de *Leishmania infantum* producidas en larvas de insecto, pp 40-63.

- Dujardin, J. (2006). Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring?. *TRENDS in Parasitology*. Vol. 22 , 1, pp. 4-6
- Dujardin, J. C.(2009). Structure, dynamics and function of *Leishmania* genome: Resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? *Infection, Genetics and Evolution*. Vol. 14, nº 7, pp. 290–297
- Dujardin, J. C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J. P., Grandoni, L., Soteriadou, K. (2008). Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 14, nº 7, pp. 1013-1018.
- Dunning, N. (2009). *Leishmania* vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. Vol. 2 nº 1, pp. 73-82
- Eichner. M. (2009). Eberhard-Karls-University. Disponível em: http://www.uni-tuebingen.de/modeling/Mod_Leish_Cycle_en.html
- Ferreira, A & Molina, J. (2000). Introdução a R: Ambiente de programação para análise de dados e gráficos. Versão 1.1.0.
- Ferreira, A., Ituassu, L., Melo, M., Andrade, A. (2008). Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, *Brazil Veterinary Parasitology*. Vol. 152, pp. 257–263.
- Ferrer.L. (2002). The pathology of canine leishmaniasis: R. Killick-Kendrick, Editor, Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum, Sevilla (2002)*, pp. 21–24.
- Fraga, J., Montalvo. A. Margarita, Doncker. S., Dujardin J. C., Gert V. A. (2009). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene, *Infection, Genetics and Evolution. Journal Elsevier*, 10, pp. 238–245
- Fujiwara, T., Vale, A., Silva, J., Costa, T., Quetz, S. (2005). Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTI1) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research* Vol. 36, pp. 827–838
- Galvez, R., Descalzo, M.A., Miro, G., Jimenez, M.I., Martin, O., Guerrero, I., Cubero, E., Molina, R. (2010). Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniasis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Tropica* vol 115, pp. 95–102

- Garrote, J. I., Purification, M. I., Miguel A. Bratos . A., Breele C., Rodriguez-Torres A. (2004). Seroloepidemiologic study of *Leishmania infantum*. Infection in Castilla-Leon, Spain. *Am. Journal Tropical Medicine*. vol 71, 4, pp. 403–406
- Gaspar, L. P., Vasconcelos R. O., Moreira, P. R. (2008). Morphological changes in the kidney of dogs with visceral leishmaniasis. Campus de Jaboticabal. *Medicina Veterinária*. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, pp. 5680-5683
- Gibson, M. E. (1983). The Identification of Kala azar and the discovery of *Leishmania Donovan*, *Medical History*, 27, pp. 203-213.
- Gollob, K. & Dutra, W. (2005). Parasitology formerly parasitology today: Insights into CD4 memory T cells following *Leishmania* infection. Vol. 21, nº 8, pp. 347–350
- Gomes, Y. M., Cavalcanti, M. P., Lira, R. A., Abath, F. G., & Alves, L. C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175, pp. 45- 52.
- Goto, Y., Howard, R.F., Bhatia, A., Trigo, J., Nakatani, M., Netto, E.M. (2009). Distinct antigen recognition pattern during zoonotic visceral leishmaniasis in humans and dog. *Veterinary Parasitology* 160, pp. 215-220
- Grupogoci. (2010). Projecto pioneiro a nível europeu – leishnet: Portugal cria primeira rede de vigilância da leishmaniose, *Veterinary Medicine*. Vol. 12, 69, pp. 7
- Ikeda-Garcia, F.A., Lopes, R.S., Ciarlini, P.C., Marques, F.J., Lima M.F., Perri, S.H.V. (2007). Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Veterinary Science*. Vol. 83, pp. 105–108
- Instituto Nacional de Estatística (1997). Conceito: Freguesia Urbana; Freguesia semi-Urbana; Freguesia Rural "Tipologia Urbano/Rural/semi-Urbano. Disponível em: http://metaweb.ine.pt/sim/conceitos/Detail.aspx?ID=PT&cnc_cod=4693&cnc_ini=29-03-2004
- James, A & Bryson, K. (2005). T helper (h) 1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunology Letters*. Vol. 99, pp. 17–23

- Katherine N., Gibson-Corley, J., Shannon J. H., Kathleen. E., Ramer-Tait, P. M., Boggiatto, C. A. (2008). Disseminated *Leishmania infantum* infection in two sibling foxhounds due to possible vertical transmission. *Can Veterinary J*, 49, pp. 1005–1008
- Komnenou. A & Koutina A. F. (2007). Ocular manifestations of some canine infectious and parasitic diseases commonly encountered in the Mediterranean EJCAP. Vol 17, nº 3, pp. 271-279
- Kulldorff, M. (1997). A spatial scan statistic. *Communications in Statistics - Theory and Methods*, Vol 26, nº 6, pp.1481-1496
- Kulldorff, M. (2010). SaTScan™ User Guide. Version 9.0
- Laura, V. M., Venturini., Romero, L. M., Roberto, J., Basso, D.F., Ubaldo, W. (2005). Capítulo 1: subreino protozoa. *Parasitología práctica y modelos de enfermedades parasitarias en los animales domésticos*, ed 1, pp. 14
- Laurent T., Auwera, G., Hide, M., Mertens, P., Quispe-Tintaya W., de Borggraeve, S. (2009). Identification of Old World *Leishmania* spp. by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Vol 63, pp. 173–181
- Laurenti M. D. (2009). Correlation between parasitological and serological diagnosis in canine american visceral leishmaniasis. *Bepa*. 6, 67, pp. 13-23
- Leandro, C., Santos-Gomes, G. M., L.Campino., Romão, P., Rolão, N., Gomes, P., *et al.* (2001). Cell mediated immunity and specific Ig1 and Ig2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 79, pp. 273-284
- Lucena S. E & Moraes R. M. (2009). Método Scan Espaço-Temporal: uma avaliação dos modelos Poisson e Permutação Espaço-Tempo. *Laboratório de Estatística Aplicada ao Processamento de Imagens e Geoprocessamento Departamento de Estatística. Universidade Federal da Paraíba*
- Luiz, N. J., Silva, M. V. M., Carlin, C. Ambrósio, C. E. (2009). A importância da leishmaniose visceral canina para a saúde pública: uma zoonose reemergente. *Revista científica electrónica de medicina veterinária Ano VII – nº 13*, pp. 1679-7353

- Lukes. J., Mauricio, I., Gabriele, S., Dujardin J. C., Ketty, S., Jean-Pierre, D., *et al.* (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Vol. 104, 22, pp. 9375 –9380
- Maia, C. & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, Vol 158, nº 4, 20 December 2008, pp. 274-287.
- Maia, C., Afonso, M., Neto, L., Dionísio, L., & Campino, L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portuga.l. *Vector Borne Diseases Journal*. Vol.46, pp. 268-272.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J., Campino, L. (2007). Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Veterinary journal*. pp. 08-09
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J., Gonçalves M. a., Campino, L. (2009). Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal*. Vol 179, pp. 142–144
- Manzillo, V. F., Paparcone, R., Cappiello, S., Santo, R., Paolo, B. (2009). Resolution of tongue lesions caused by *Leishmania infantum* in a dog treated with the association miltefosine-allopurinol *Parasites & Vectors*, 2, pp.1-4
- Martin, A. S & Diaz, N. L. (2004). Organ- specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Journal Tropical Medicine*. Vol 70, 6, pp. 618–624
- Meek, P. D.(1999). The movement, roaming behaviour and home range of free-roaming domestic dogs, *Canis lupus familiaris*, in coastal New South Wales. *Wildlife Research*. Vol 26, nº6, pp. 847 - 855
- Meireles, J. (2008). Capítulo VII: Terapêutica e profilaxia da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A, pp. 93-99
- Melo, F. M., Lima, W., Andrade, M., Michalick, M., Raso, P, Tafuri, W. (2008). Diffuse Intralobular Liver Fibrosis in Dogs Naturally Infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Journal Tropical Medicine*. Vol. 79, 2, pp. 198–204

- Miles, M., Dujuardim., Shonian, C. (2005). European Project: *Leish domus*. Disponível em: <http://www.leishdomus.org/leish.htm>
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L. & Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs, *Research in Veterinary Science*, 85, pp. 35–38
- Miró, G. (2005). Manejo clínico de la leishmaniosis canina: podemos unificar criterios? *Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España*, pp. 44-48.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis - part two. *Trends in parasitology*, pp. 371-377.
- Miro, G., Mateo M., Montoya A., Descalzo, M., Molina, R. (2007). Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Veterinary Parasitology*. Vol 143, pp. 375–379
- Moraitou, K. K., Rallis, T. S., Koutinas, A. F., Tontis, D., Plevraki, K., & Kritsepi, M. (2007). Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *American Journal of Tropical Medicine and Higyene* , 76, pp. 53-57.
- Moreira, M.A.B., Luvizotto, M.C.R., Garcia, J.F., Corbett, C.E.P., Laurenti, M.D. (2007). Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, 145, pp. 245-252.
- Moreno, A., Gómez-Nieto, C., Hernández-Rodríguez, S. (1999). Leishmaniosis canina.
- Moreno, J., & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model, *Trends in Parasitology*, 18, 9, pp. 399-444
- Naderer, T., Wee, E. & McConville, M. (2008). The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective. *Journal Compilation Cellular Microbiology*. Vol 10, 2, pp. 301–308
- Nogueira, F.S., Moreira, M.A.B., Borja-Cabrera G.P., Santos, F.N., Menz, I., Palatnik-de-Sousa, C.B., Luvizotto R. (2005). Leishmune® vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*. Vol. 23, pp. 4805-4810

- Ochoa, P., Castillo, J., Gascón, M., Zarate, J., Alvarez, F., & Couto, C. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *The Veterinary Journal*. Vol. 179, pp. 259-263.
- OIE. (2008). Leishmaniosis, capítulo 2: OIE Terrestrial Manual. Vol 1, 8, pp. 240-249
- OIE: The World Organisation for Animal Health (2004). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Leishmaniosis. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00050.htm
- Otranto, D., Dantas-Torres, Edward, F. B. (2009). Breitschwerdt Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends in Parasitology*. Vol. 25, nº4, pp. 157-163
- Otranto, D., Paradies, P., Caprariis, D. (2009). Leishmaniasis Is Endemic Dogs in an Area Where *Leishmania infantum* Infection in Asymptomatic Toward Diagnosing. Clinical and Vaccine Immunology. Vol 16, nº3, pp. 337–343
- Otranto, D., Testini, G., Dantas-Torres, F., Latrofa, S., Donato de Caprariis., Riccardo P. L., *et al.* (2010). Diagnosis of Canine Vector-Borne Diseases in Young Dogs: a Longitudinal Study. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 48, nº. 9 pp. 3316–3324
- Palatnik-de-Sousa. C.B. (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Journal Vaccine*. Vol. 26, pp. 1709-1724.
- Papadopoulou, C., Kostoul, A., Dimitriou, D., Panagiou, A., Bobojianni, C., Antoniadis, G. (2005). Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *Journal of Infection*. Vol 50, pp. 53–60
- Pereira da Fonseca, I., & Villa de Brito, M. (2008). Capítulo IV: Diagnóstico. In G. Santos Gomes, & I. Pereira Fonseca, I. M. (Eds.) Leishmaniose Canina. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A, pp. 83-92.
- Petersen, A. C. (2009). New Means of Canine Leishmaniasis Transmission in North America: The Possibility of Transmission to Humans Still Unknown. Article ID 802712, pp. 5
- Pina. M. F & Olhero. A. (2004). Georeferenciação de dados em micro-áreas. Desafio à utilização dos SIG na área da saúde Instituto de Engenharia Biomédica. Serviço de Higiene e Epidemiologia, Faculdade de Medicina do Porto

- Pinhão, C. (2009). Leishmaniose Canina: Estudo de 158 casos da região de Lisboa. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.
- Porrozzi, R., Costa, M.V.S., Teva, A, Falqueto, A., Ferreira, A.L., Santos, C.D., Fernandes, A.P., et al. (2007). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14, 5, pp. 544- 548.
- Ready, P. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Review of the Department of Entomology*, Natural History Museum, London, United Kingdom, pp. 1-11
- Reis, A. B., Giunchetti, R. C., Carrillo, E., Olindo A., Moreno, J. (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. Vol. 26 nº 7 pp. 341–349
- Rodriguez-cortes, A., Ojeda, A., lopes fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano- Gagello, L., Sanchez-Robert, E., Francino. (2007). A long term experimental study of canine visveral leishmaniasis. *In Journal parasitology*. Vol. 37, pp. 683-693.
- Rosenthal, E. & Marty, P. (2009). Actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. *La Revue de Médecine Interne*. Vol 30, pp. 24–28
- Rotureau. B. (2006). Ecology of the *Leishmania* species in the guianan ecoregion complex. *Am. Journal Tropical Medicine*. Vol 74, 1, pp. 81–96
- Santos-Gomes, G. M ., Campino, L., Abranches, P. (2000). Canine Experimental Infection: Intradermal Inoculation of *Leishmania infantum* Promastigotes. *Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa*. Vol. 95, 2, pp. 193-198
- Santos-Gomes, G. M., Capela, M.J., Ramada, R.J., Campino, L. (2003). Experimental canine leishmaniasis: evolution of infection following re-challenge with *Leishmania infantum*, *Acta Tropica*. Vol. 87, pp. 235-244
- Saraiva, L. (2008). Estudos da fauna flebotomínica (diptera: psychodidae: *Phlebotominae*), sua infecção natural por *Leishmania* spp. e aspectos biogeográficos da leishmaniose visceral, na regional nordeste do município de Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil.
- Saridomichelakis, M., Mylonakis, M., Leontides, L., Koutinas, A., Billinis, C., & Kontos, V. (2005). Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine

- leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and assymptomatic dogs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 130, pp. 82-86.
- Silva, A. G. (2009). Dissertação de Mestrado: Leishmaniose canina na zona do Pinhal, pp14-17.
- Silva, F. S. (2007). Pathology and pathogenesis of canine visceral leishmaniasis. *Revista Tropica – Ciencias Agrarias e Biologicas*. Vol. 1,1, pp. 20
- Sima-Rafati, A. K., Davoudi N., Maboudi, F. (2006). Leishmaniasis vaccine candidates for development: A global overview. *Indian Journal Medicine*. Vol. 123, pp. 423-438
- Simon, L. C., Shyam, S., Fairlam, H. (2006). Drug Resistance in Leishmaniasis Clinical *Microbiology Reviews*. Vol 19, nº 1, pp. 111–126
- Siviero, E. C., & Furtado, V. T. (2005). Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. *Brasil journal of Dermatology*, 80,4, pp. 421-448
- Smith, J. (2008). Infection prevalence and vector-borne transmission: are vectors always to blame?. *Trends in Parasitology*. Vol. 24 nº 11, pp. 492-496
- Solano-Gallego, L., Koutinas A., Miró, G., Cardoso L., Pennisi M., Ferrer L., Bourdeau P. Oliva G. & Baneth G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Review Veterinary Parasitology*. Vol. 165, pp.1–18
- Solano-gallego, L., Lullul, J., Ramis, A., Fernandez-Bellon, Hugo. (2005). Longitudial study of dogs living in na área of spain highly endemic for leishmaniais by serologic analysis and the leishmanin skin test. *Journal Tropical Medicine*. Vol. 72, 6, pp. 815–818
- Solano-Gallego, L., Rodríguez, A., Iniesta, L., Arboix, M., Portús, M., Alberola, J. (2003b). Detection of anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol 10, nº 5, pp. 849-855.
- Solano-Gallego, L., Rodríguez-Cortés, A., Iniesta, L., Quintana, J., Pastor, J., Espada, Y., Portús, M. & Alberola, J. (2007). Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the northwestern Mediterranean. *JournalTropical Medicine*.Vol 76, pp. 676–680

- Solano-Gallego, L.; Llull, J.; Ramos, G.; Riera, C.; Arboix, M.; Alberola, J.; Ferrer, L. (2000). The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*. 90. pp. 37-45
- Soong, L. (2008). Modulation of Dendritic Cell Function by *Leishmania* Parasites. *Journal Immunology*. Vol. 180, pp. 4355-4360
- Souza, A. I., Juliano, R. S., Gomes, T. S., Diniz, S. A., Tafuri, W. L., Borges, A. M., *et al.* (2005). Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Veterinary Parasitology*, 129, pp. 51-54
- Spath, G., Garraway, L., Turco, S., & Beverley, S. (2003). The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 100, nº16, pp. 9536–9541.
- Tomás, A. & Freitas Romão, S. (2008). Capítulo I: Biologia do parasita. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.) *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., 2008, pp. 27-40
- Ziad, A, Harou, M., Khanfar, C., Obaida, Y., Lionel, F. S. (2002). Epidemiology of visceral *Leishmania* in the Jenin district, West Bank: 1989–1998. *Journal Tropical Medicine*. Vol 66, 4, pp. 329–333

Anexos

Anexo 1- Caso clínico: leishmaniose visceral humana

No ano de 2010, uma criança de 12 meses pertencente ao concelho de Proença-a-Nova apresentou-se no hospital de Castelo-Branco com os seguintes sinais clínicos:

Febre elevada oscilante entre os 39 e os 40 °C; poliúria; rinorréia purulenta e perfusão periférica diminuída.

Para estabelecer o diagnóstico efectuou-se Rx, análises hematológicas e bioquímicas, detectando-se hiperbilirrubinémia.

Depois de 3 meses em consultas, no hospital de Castelo Branco, foi transferida para a unidade de pediatria do hospital de Coimbra, por não apresentar melhorias na terapêutica instituída.

Foi efectuado medulograma após o qual se confirmou infecção por *Leishmania*.

A terapêutica instituída consistiu na administração de anfotericina B lisosómica, durante 5 dias e um reforço ao dia 14 e 21. A criança recuperou logo durante o tratamento.

O diagnóstico diferencial proposto:

Linfoma; leucemia; pneumonia; gripe.

Anexo 2 - Inquérito

Nome do Dono: _____

Contacto telefónico: _____

Endereço de código postal com 7 dígitos: _____

Nome do cão: _____

Idade (Data de nascimento): _____

Sexo: _____

Pêlo: (curto, médio ou grande) _____

Aptidão (guarda; companhia; caça; animal errante): _____

Habitat (rua; casa; rua/casa; animal errante.): _____

Sinais clínicos de Leishmaniose: _____

Nota:

Os animais foram todos inspeccionados e considerados suspeitos quando pelo menos um sinal clínico era compatível com leishmaniose:

Sinais clínicos considerados:

Dermatite, alopecia, linfadenopatia localizada ou generalizada, ulceração cutânea, onicogribose, claudicação, perda de peso, epistaxis e anemia.

Anexo 3 - Soluções finais a aplicar na placa de diagnóstico

1. Solução tampão para carregamento "Coating"

Solução 1: pH 8.4			Solução 2: pH 11.3		
Reagentes	Fórmula	Quantidade	Reagentes	Fórmula	Quantidade
Carbonato de sódio	Na ₂ HCO ₃	2.1 g	Carbonato de sódio	Na ₂ CO ₃	2.65 g
Azida de sódio	NaN ₃	0,1 g	Azida de sódio	NaN ₃	0,1 g
Para um pH de 8.4 - Adicionar HCl (2M) Perfazer até 500ml, com água destilada			Para um pH de 11.3 - Adicionar HCl (2M) Perfazer até 500ml, com água destilada		
Solução 3 (final): pH 9.6					
Adicionar duas partes da solução 2 a uma parte da solução 1					
Acertar pH 9,6					
Manter a 4 ° C					

2. Solução de lavagem (0.3%): 1L PBS/ Tween 20

Reagentes	Fórmula	Quantidade
Cloreto de sódio	NaCl	8 g
Dihidrogenofosfato de potássio	KH_2PO_4	0.2 g
Hidrogenofosfato dissódico	Na_2HPO_4	1.4 g
Cloreto de potássio	KCl	0.2 g
Azida de sódio	NaN_3	0.2 g
Tween 20		3 ml

3. Solução de diluição: PBS + Tween 20 + Hgb bovino

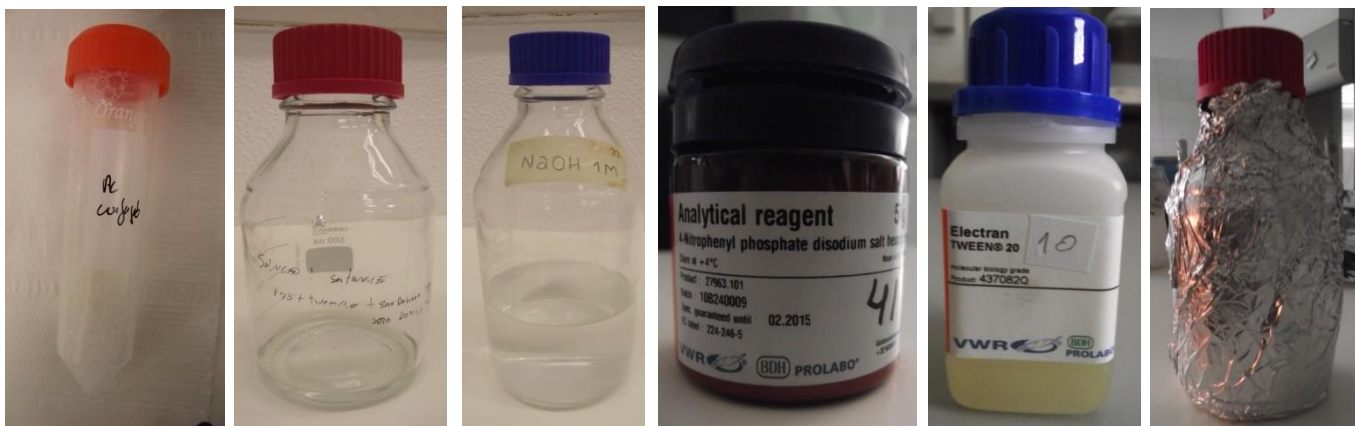
Reagentes	Fórmula	Quantidade
Cloreto de sódio	NaCl	8 g
Dihidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	0.2g
Hidrogenofosfato dissódico	Na ₂ HPO ₄	1.4 g
Cloreto de potássio	KCl	0.2 g
Azida de sódio	NaN ₃	0.2 g
Tween 20		3 ml
Hemoglobina de Bovino		0.5 g

Para um pH 7,2-7,4 - adicionar HCl a 2M, e de seguida perfazer até 1L com água destilada, Manter a 4 °C;

4. Solução tampão substrato pH 9,8

Reagentes	Fórmula	Quantidade
Dietanolamina	C ₄ H ₁₁ NO ₂	52.55 g
Cloreto de magnésio hexahidratado	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,05 g

Incubar a dietanolamina durante 30 min a 37 °C (ponto de fusão: 25-28 °C);
Adicionar água destilada até perfazer 500 ml;



4.1. Reagentes e soluções utilizadas para o protocolo de ELISA

Anexo 4 - Diluição do antígeno com a finalidade de preparar a solução de carregamento para aplicação na placa de ELISA

1. Volume final da solução de carregamento “coating”

- 96 poços x 4 placas x 50 μ l = 19,200ml.
- O Volume final necessário, estabelecido foi 25 ml

2. Concentração do Ag (Concentração inicial)

- C = 1520 μ g/ml

3. Concentração do antígeno pretendido (Concentração final)

- C1 1 μ g-----50 μ ml (poço) / aplicar em 4 placas
- C2 3 μ g-----50 μ ml (poço) / aplicar em 4 placas

4. Quais os volumes de antígeno a adicionar a 25 ml (tubo 1 e 2) de Solução 3, para obter as concentrações pretendidas (C1 e C2) ?

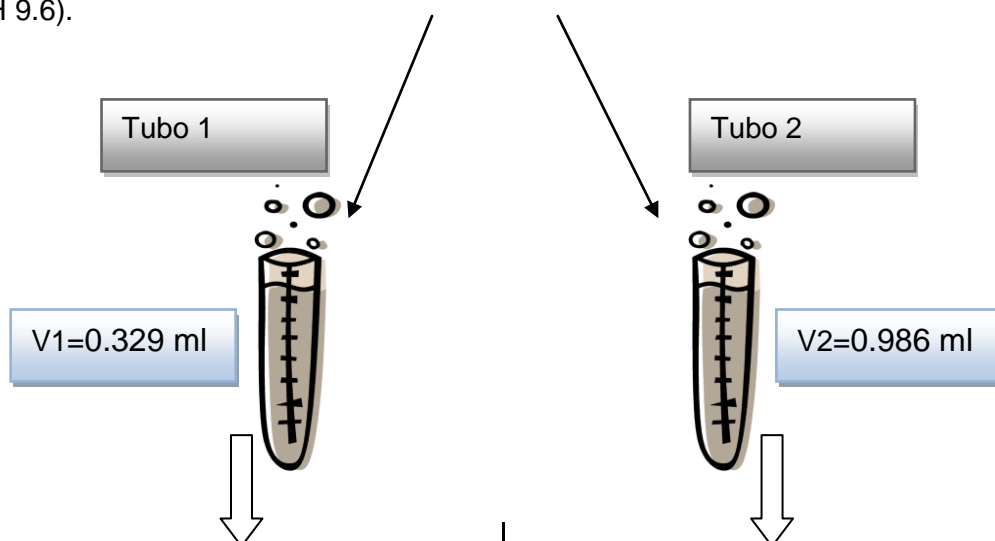
- Para a concentração de 1 μ g em 50 μ l (C1), ou seja, 20 μ g/ml

1 μ g ----- 50 μ l	1520 μ g ----- 1 ml
X μ g ---- 25000 μ l <= X = 500 μ g	500 μ g ----- V1 <= V1 = 0.329ml

- Para a concentração de 3 μ g em 50 μ l (C2), ou seja, 40 μ g/ml

3 μ g ----- 50 μ l	1520 μ g ----- 1 ml
X μ g ----- 25000 μ l <= X = 1500 μ g	1500 ----- V2 <= V2 = 0.986 ml

5. Adicionou-se para um volume total de 25 ml (cada tubo), um volume de V1 e V2 (Solução 3: pH 9.6).



Adicionou-se 50 μ l do tubo 1 a cada poço de quatro placas de diagnóstico

Adicionou-se 60 μ l do tubo 2 a cada poço de quatro placas de diagnóstico

Anexo 5 - Caracterização das freguesias de acordo com a densidade populacional

Quanto à caracterização das freguesias, segundo o Instituto Nacional de Estatística, 1997 e de acordo com a densidade populacional considera-se freguesia urbana - freguesias com densidade populacional superior a 500 habitantes (hab) /Km² ou que integrem um lugar com população residente superior ou igual a 5000 habitantes.

Freguesia semi-urbana - freguesias que possuam densidade populacional superior a 100 hab/Km² e inferior ou igual a 500 hab/Km², ou que integrem um lugar com população residente superior ou igual a 2000 habitantes e inferior a 5000 habitante. Sendo as freguesias rurais todas as outras não descritas acima.

Segundo os censo de 2001 e de acordo com as definições acima descritas considera-se que:

O Concelho de Proença-a-Nova, que engloba a freguesia de Alvito da Beira, S. Pedro do Esteval, Peral, Montes da senhora, Sobreira formosa e Proença-a-Nova, apresenta apenas as duas últimas freguesias referidas como semi-urbanas e as restantes como rurais.

O Concelho de mação que engloba a freguesia de Cardigos, Ortiga, Aboboreira, Carvoeiro, Evendos, Mação, Penhascoso, apresenta apenas como freguesia semi-urbana a freguesia de mação sendo as restantes consideradas rurais.

O Concelho de Vila de Rei, que engloba as freguesias de São João do Peso, Fundada e Vila de Rei, apenas é considerada freguesia semi-urbana, Vila de Rei sendo as restantes freguesias rurais.

Anexo 6 - Nomenclatura CORINE Land Cover

Nível 1	Nível 2	Nível 3
1 Territórios artificializados	1.1 Tecido urbano	1.1.1 Tecido urbano contínuo 1.1.2 Tecido urbano descontínuo
	1.2 Indústria, comércio e transportes	1.2.1 Indústria, comércio e equipamentos gerais 1.2.2 Redes viárias e ferroviárias e espaços associados 1.2.3 Áreas portuárias 1.2.4 Aeroportos e aeródromos
	1.3 Áreas de extracção de inertes, áreas de deposição de resíduos e estaleiros de construção	1.3.1 Áreas de extracção de inertes 1.3.2 Áreas de deposição de resíduos 1.3.3 Áreas em construção
	1.4 Espaços verdes urbanos, equipamentos desportivos, culturais e de lazer, e zonas históricas	1.4.1 Espaços verdes urbanos 1.4.2 Equipamentos desportivos, culturais e de lazer e zonas históricas
2 Áreas agrícolas e agro-florestais	2.1 Culturas temporárias	2.1.1 Culturas temporárias de sequeiro 2.1.2 Culturas temporárias de regadio 2.1.3 Arrozais
	2.2 Culturas permanentes	2.2.1 Vinhas 2.2.2 Pomares 2.2.3 Olivais
	2.3 Pastagens permanentes	2.3.1 Pastagens permanentes
	2.4 Áreas agrícolas heterogéneas	2.4.1 Culturas temporárias e/ou pastagens associadas a culturas permanentes 2.4.2 Sistemas culturais e parcelares complexos 2.4.3 Agricultura com espaços naturais e semi-naturais 2.4.4 Sistemas agro-florestais
3 Florestas e meios naturais e semi-naturais	3.1 Florestas	3.1.1 Florestas de folhosas 3.1.2 Florestas de resinosas 3.1.3 Florestas mistas
	3.2 Florestas abertas, vegetação arbustiva e herbácea	3.2.1 Vegetação herbácea natural 3.2.2 Matos 3.2.3 Vegetação esclerófila 3.2.4 Florestas abertas, cortes e novas plantações
	3.3 Zonas descobertas e com pouca vegetação	3.3.1 Praias, dunas e areais 3.3.2 Rocha nua 3.3.3 Vegetação esparsa 3.3.4 Áreas ardidas 3.3.5 Neves eternas e glaciares
4 Zonas húmidas	4.1 Zonas húmidas interiores	4.1.1 Paúis 4.1.2 Turfeiras
	4.2 Zonas húmidas litorais	4.2.1 Sapais 4.2.2 Salinas e aquicultura litoral 4.2.3 Zonas entre-marés
5 Corpos de água	5.1 Águas interiores	5.1.1 Cursos de água 5.1.2 Planos de água
	5.2 Águas marinhas e costeiras	5.2.1 Lagoas costeiras 5.2.2 Desembocaduras fluviais 5.2.3 Oceano

6. Nomenclatura CORINE Land Cover (Adaptado de Caetano *et al.*, 2007)

Anexo 7 - Caracterização da amostra respeitante ao rastreio de leishmaniose a 282 canídeos

Nº	RI	Idade (anos)	Sexo	Pêlo	Sinais Clínicos	Aptidão	Habitat	Localidade	XCOORD (Cartesianos)	YCOORD (cartesianos)
1	N	6	M	MD	N	G	R/Cs	Vale	-887974,99	4827138,73
2	N	4	M	CT	N	G	R/Cs	Vale	-887974,99	4827138,73
3	N	6	M	CT	N	G	R	Vale	-887974,99	4827138,73
4	N	5	M	CT	N	G	R	Vale	-887974,99	4827138,73
5	N	6	F	MD	S	C	Cs	Vale	-887974,99	4827138,73
6	N	2	F	MD	N	C	Cs	Vale	-887974,99	4827138,73
7	N	5	M	CT	S	C	Cs	Vale	-887974,99	4827138,73
8	P	10	F	CT	S	C	Cs	Vale	-887974,99	4827138,73
9	N	7	M	CT	N	G	Cs	Carrascal	-888182,58	4825799,82
10	N	10	M	CT	N	C	R/Cs	Carrascal	-888182,58	4825799,82
11	N	1	M	MD	N	G	R	Chaveira	-890116,84	4825498,8
12	P	6	F	MD	N	G	R	Chaveira	-890116,84	4825498,8
13	N	3	M	CT	N	C	R	Casais de São Bento	-891990,9	4826388,42
14	N	5	M	CT	N	C	R	Casais de São Bento	-891990,9	4826388,42
15	P	7	M	CT	N	G	R	Casalinho	-891226,99	4822837,74
16	N	1,5	M	MD	N	Ca	R	Cardigos	-892681,38	4821671,89
17	P	4	F	CT	N	Ca	R	Cardigos	-892681,38	4821671,89
18	N	7	F	CT	N	Ca	R	Casas da ribeira	-894644,12	4823903,92
19	N	2	M	CT	N	Ca	R	Casas da ribeira	-894644,12	4823903,92
20	N	3	M	MD	N	C	R	Corujeira	-893516,94	4822828,26
21	N	5	F	CT	N	Ca	R	Azinhal	-895107,54	4821876,31
22	N	2	M	MD	N	G	R	Pereiro Cimeiro	-900989,8	4810062,12
23	N	1,5	M	MD	N	G	R	Pereiro Cimeiro	-900989,8	4810062,12
24	N	4	M	MD	N	G	R	Pereiro Cimeiro	-900989,8	4810062,12
25	N	2	M	CT	N	Ca	R	Milreu	-906231,72	4812355,2
26	P	8	M	CT	N	G	R	Brejo Cimeiro	-906881,93	4818592,83
27	N	2	M	MD	N	G	R	Brejo Fundeiro	-908562,64	4814245,88
28	N	3	F	CT	N	Ca	R	Brejo Fundeiro	-908562,64	4814245,88
29	N	8	M	CT	N	G	R	Pisão Fundeiro	-907091,5	4814155
30	N	12	F	CT	N	G	R	Vila de Rei	-906896,3	4818869,5
31	N	3	F	CT	N	Ca	R	Vila de rei	-906896,3	4818869,5
32	N	12	F	CT	N	Ca	R	Rua do norte/ Vila de Rei	-906752,33	4819094,76
33	N	3	M	MD	N	C	Cs	Vila de Rei	-906896,3	4818869,5
34	N	5	F	MD	N	C	Cs	Vila de Rei	-906896,3	4818869,5
35	P	4	F	CT	N	Ca	R	Vila de rei	-906896,3	4818869,5
36	N	3	F	CT	S	Ca	R	Estação da Ortiga	-892755,22	4791537,98
37	N	3	F	CT	N	Ca	R	Estação da Ortiga	-892755,22	4791537,98
38	N	12	F	MD	N	Ca	R	Estação da	-892755,22	4791537,98

								Ortiga		
39	N	6	M	MD	S	Ca	R	Estação da Ortiga	-892755,22	4791537,98
40	N	9 m	M	MD	N	Ca	R	Estação da Ortiga	-892755,22	4791537,98
41	N	2	M	CT	N	G	R	Ortiga	-892902,2	4791385,8
42	N	1	M	CT	N	C	Cs	Estação da Ortiga	-892755,22	4791537,98
43	N	4	F	CT	S	Ca	R	Estação da Ortiga	-892755,22	4791537,98
44	N	3	F	CT	N	Ca	R	Estação da Ortiga	-892755,22	4791537,98
45	N	2	M	CT	N	Ca	R	Estação da Ortiga	-892755,22	4791537,98
46	N	3	M	CT	N	G	R	Estação da Ortiga	-892755,22	4791537,98
47	N	10	M	MD	N	C	Cs	Estação da Ortiga	-892755,22	4791537,98
48	N	5	F	MD	S	Ca	R	Ortiga	-892902,2	4791385,8
49	N	1	M	CT	N	C	R	Ortiga	-892902,2	4791385,8
50	N	5	M	MD	N	C	Cs	Ortiga	-892902,2	4791385,8
51	N	1	M	MD	N	Ca	R	Barragem de belver	-892180,15	4790072,09
52	N	3	M	MD	N	Ca	R	Barragem de belver	-892180,15	4790072,09
53	N	10	F	MD	N	G	R	rua das cercas/ Penhascoso	-894829,25	4799324,32
54	p	3	M	CT	N	Ca	R	Ortiga	-892902,2	4791385,8
55	P	2	M	CT	N	Ca	R	Ortiga	-892902,2	4791385,8
56	N	5	M	CT	N	C	Cs	Ortiga	-892902,2	4791385,8
57	N	7	M	CT	S	Ca	R	Aboboreira	-896674,4	4806002,44
58	N	5	F	MD	N	Ca	R	Aboboreira	-896674,4	4806002,44
59	N	5	M	CT	N	Ca	R	Chão de codes	-896384,73	4810149,28
60	N	1	M	CO	N	G	R	Chão de codes	-896384,73	4810149,28
61	N	7 m	M	CT	N	C	R/Cs	Chão de codes	-896384,73	4810149,28
62	N	2	M	CT	N	Ca	R	Chão de codes	-896384,73	4810149,28
63	N	5	M	MD	N	Ca	R	Chão de codes	-896384,73	4810149,28
64	N	10	M	CO	N	G	R	Chão de lopes	-898074,53	4816463,47
65	N	1	M	MD	N	Ca	R	Chão de lopes	-898074,53	4816463,47
66	N	1	M	MD	N	Ca	R	Chão de lopes	-898074,53	4816463,47
67	N	5	F	MD	S	Ca	R	Maxiais	-876648,8	4803417,72
68	N	5	M	MD	N	Ca	R	Montargil	-874210,76	4798473,79
69	N	4	M	CO	N	Ca	R	Sanguinheira	-886458,37	4813081,96
70	N	4	F	CT	N	G	R	Sanguinheira	-886458,37	4813081,96
71	N	3	M	CT	S	Ca	R	Evendos	-890107,57	4801708,25
72	N	6 m	M	CT	N	G	R	Evendos	-890107,57	4801708,25
73	N	2	M	CT	N	G	R	Evendos	-890107,57	4801708,25
74	N	2	M	MD	N	G	R	Evendos	-890107,57	4801708,25
75	N	8	M	CT	N	Ca	R	Evendos	-890107,57	4801708,25
76	N	4	F	MD	N	Ca	R	Evendos	-890107,57	4801708,25
77	N	5	M	MD	N	G	R/Cs	São jose das matas	-873921,65	4797971,93

78	P	7	M	MD	S	G	R/Cs	São Jose das Matas	-873921,65	4797971,93
79	N	2	F	MD	N	G	R	Cumeada	-874127,89	4797741,56
80	N	3	M	CO	N	G	R/Cs	Cumeada/ Evendos	-874127,89	4797741,56
81	P	5	M	MD	N	Ca	R	Zimbreirinhas	-876390,34	4798267,65
82	N	5	M	MD	N	Ca	R	A vessada	-878218,84	4799825,77
83	N	6	M	MD	N	Ca	R	Rua das cercas/ Penhascoso	-894829,25	4799324,32
84	N	6	M	CO	N	C	Cs	Rua das cercas/ Penhascoso	-894829,25	4799324,32
85	P	6	F	MD	N	C	Cs	Travessa do espirito santo/ Penhascoso	-894785,95	4799581,87
86	p	2	M	CT	N	G	R/Cs	Travessa lameira da vila	-895307,01	4798599,55
87	N	2	F	CT	N	G	R/Cs	Travessa lameira da vila	-895307,01	4798599,55
88	N	12	F	CT	S	C	Cs	Travessa lameira da vila	-895307,01	4798599,55
89	N	5	M	MD	S	C	Cs	Travessa lameira da vila	-895307,01	4798599,55
90	N	8	F	CT	N	G	R/Cs	Portela de Sardoal	-899657,74	4805485,2
91	P	7	F	CT	S	Ca	R	Rua da igreja/ Penhascoso	-899180,32	4805426,26
92	P	5	M	CT	N	Ca	R	Rua da igreja/ Penhascoso	-899180,32	4805426,26
93	N	10	F	CT	N	G	Cs	Rua da igreja/ Penhascoso	-899180,32	4805426,26
94	N	6	M	CT	S	Ca	R	Queixoperra	-898540,76	4800771,44
95	P	2	M	MD	N	Ca	R	Queixoperra	-898540,76	4800771,44
96	N	7	M	MD	N	G	R	Queixoperra	-898540,76	4800771,44
97	N	9	M	CT	N	Ca	R	Queixoperra	-898540,76	4800771,44
98	N	4	F	CT	N	G	R	Queixoperra	-898540,76	4800771,44
99	N	3	M	CT	N	Ca	R	Queixoperra	-898540,76	4800771,44
100	P	18 m	F	CT	N	Ca	R	Queixoperra	-898540,76	4800771,44
101	N	11	F	CT	S	Ca	R	Queixoperra	-898540,76	4800771,44
102	N	8	M	CT	N	Ca	R	Queixoperra	-898540,76	4800771,44
103	N	10	F	MD	S	Ca	R	Queixoperra	-898540,76	4800771,44
104	P	5	F	CT	N	C	Cs	Casal novo	-899250,99	4810855,94
105	P	18 m	F	CT	N	C	R/Cs	Borda da ribeira	-901322,31	4810058,36
106	N	3,5	M	CT	N	C	R/Cs	Borda da ribeira	-901322,31	4810058,36
107	P	8	M	CT	S	Ca	R	Estevais	-911079,32	4820444,88
108	P	8	M	CT	N	Ca	R	Lousa	-903855,16	4811265,61
109	p	5	M	MD	S	Ca	R	Lousa	-903855,16	4811265,61
110	N	10	M	MD	S	G	R	Boafarinha	-902739,87	4820504,75
111	N	14	M	CT	N	G	R	Borreiro	-900332,46	4815566,75
112	P	6	F	CT	S	G	Cs	Borreiro	-900332,46	4815566,75
113	P	3	F	CT	N	C	Cs	Borreiro	-900332,46	4815566,75
114	P	5	M	CT	N	G	R	Lavadouro	-908190,43	4821244,85
115	N	8	M	CT	N	Ca	R	Lavadouro	-908190,43	4821244,85
116	N	9	M	MD	N	Ca	R	Lousa	-903855,16	4811265,61

117	N	7	F	MD	N	C	Cs	Estevais	-911079,32	4820444,88
118	P	3	M	CT	S	G	R	Estevais	-911079,32	4820444,88
119	P	4	M	CT	N	G	R	Maciera	-911830,43	4814170,23
120	P	3	M	CT	N	C	Cs	Fouto	-907024,29	4826475,31
121	P	8 m	F	MD	N	Ca	R	Cabeça do Poço	-904537,2	4825525,85
122	P	5	M	CT	N	G	R	Fundada	-906575,04	4825606,38
123	P	10	M	CT	N	Ca	R	Avenida Doutor Sá Carneiro	-906861,6	4818692,34
124	P	7	M	CT	N	Ca	R	Rua Principal	-904818,72	4825507,69
125	P	2	M	CT	S	C	Cs	Fundada	-906575,04	4825606,38
126	N	3	M	CT	N	C	Cs	Fundada	-906575,04	4825606,38
127	P	4	M	MD	N	G	R	Rua da Escola	-910511,36	4828664,09
128	P	7	F	MD	N	G	R	Fouto	-907024,29	4826475,31
129	P	3	M	CT	N	Ca	R	Vilar do Ruivo	-910760,78	4828776,3
130	P	8	M	MD	S	G	R/Cs	Cabeça Do Poço	-904537,2	4825525,85
131	P	10	M	CT	S	G	R	Fonte das Eiras	-905801,75	4824890,35
132	P	2	F	CT	S	Ca	R	São João do Peso	-898473,41	4824816,3
133	P	10	M	MD	N	C	R/Cs	São João do Peso	-898473,41	4824816,3
134	P	8	M	CT	N	G	R/Cs	Eira Velha	-900090,81	4820131,29
135	P	4	F	CT	N	Ca	R	Vila de Rei	-906896,3	4818869,5
136	N	2	M	CT	N	C	Cs	Vila de Rei	-906896,3	4818869,5
137	N	12	M	MD	N	C	R/Cs	Aldeia do Couço	-900032,87	4819258,4
138	N	5	M	CT	S	G	R	Portela do Curral	-900065,52	4818857,22
139	P	5	M	CT	S	G	R	Portela do Curral	-900065,52	4818857,22
140	P	9	F	CT	S	G	R	Alvito da beira	-868313,5	4840609,7
141	P	8	F	CT	N	G	R	Alvito da beira	-868313,5	4840609,7
142	P	5	F	CT	N	C	Cs	Dáspera	-866357,37	4845307,67
143	P	3	F	CT	N	C	R/Cs	Dáspera	-866357,37	4845307,67
144	N	7	F	MD	N	C	Cs	Herdade	-869673,11	4844025,57
145	P	8	F	MD	N	G	R/Cs	Mó	-865365,71	4843120,25
146	N	4	M	MD	N	G	R/Cs	Catraia Cimeira	-867049,36	4836265,04
147	P	3	F	CT	S	G	R/Cs	Catraia Cimeira	-867049,36	4836265,04
148	N	2	M	CT	S	G	R	Venda	-867960,09	4837009,92
149	P	4	F	CT	N	G	R/Cs	Sobrainho dos Gaios	-866730,86	4839759,48
150	N	2	F	CT	N	C	R/Cs	Sobrainho dos Gaios	-866730,86	4839759,48
151	P	5	M	CT	S	G	R	Proença-a-Nova	-882232,14	4829649,23
152	P	11	M	CT	S	G	R	Pergulhos	-878766,74	4820384,33
153	P	5	M	CO	N	G	R/Cs	Pergulhos	-878766,74	4820384,33
154	P	3	M	CT	N	G	R/Cs	Pergulhos	-878766,74	4820384,33
155	N	8	M	MD	S	G	R	Pergulhos	-878766,74	4820384,33
156	P	11	M	MD	S	G	R	Pergulhos	-878766,74	4820384,33
157	P	8	F	CO	S	Ca	R	Vale Água	-881816,23	4820307,51
158	P	5	F	CO	S	Ca	R	Vale Água	-881816,23	4820307,51

159	P	3	M	MD	N	Ca	R	Vale Água	-881816,23	4820307,51
160	N	8	F	MD	S	Ca	R	Vale Água	-881816,23	4820307,51
161	P	5	M	CT	N	Ca	R	Vale Água	-881816,23	4820307,51
162	P	4	M	CT	N	Ca	R	Vale Água	-881816,23	4820307,51
163	P	4	M	CT	N	Ca	R	Vale Água	-881816,23	4820307,51
164	P	2	M	MD	N	G	R/Cs	Proença-a-Nova	-882232,14	4829649,23
165	P	3	M	MD	N	Ca	R	Proença-a-Nova	-882232,14	4829649,23
166	N	2	M	CT	N	Ca	R	Proença-a-Nova	-882232,14	4829649,23
167	N	5	F	MD	N	Ca	R	Proença-a-Nova	-882232,14	4829649,23
168	N	3	M	CT	N	Ca	R	Proença-a-Nova	-882232,14	4829649,23
169	N	2	M	CT	N	Ca	R	Proença-a-Nova	-882232,14	4829649,23
170	P	5	F	MD	N	Ca	R	Proença-a-Nova	-882232,14	4829649,23
171	p	10	M	CT	N	G	R	Aldeia Cimeira	-869290,57	4834644,28
172	P	5	F	CT	N	G	Cs	Aldeia Cimeira	-869290,57	4834644,28
173	P	4	M	CT	N	C	Cs	Aldeia Cimeira	-869290,57	4834644,28
174	N	8	M	CT	N	G	R	Montes da Senhora	-868950,54	4833705,5
175	P	6	M	CT	S	G	R	Monte Barbo	-870281,07	4833344,99
176	N	2	M	CT	N	G	Cs	Monte Barbo	-870281,07	4833344,99
177	N	6	M	CO	N	G	Cs	Monte Barbo	-870281,07	4833344,99
178	P	7	F	CT	N	G	R	Montes da Senhora	-868950,54	4833705,5
179	N	2	F	CT	N	G	R	Montes da Senhora	-868950,54	4833705,5
180	N	8	M	CT	N	G	R	Chão do Galego	-866712,5	4833114,36
181	N	6	F	CT	N	Ca	R	Chão do Galego	-866712,5	4833114,36
182	N	6	F	CT	N	C	R/Cs	Rabacinas	-865852,75	4830750,37
183	P	5	F	CT	N	G	R/Cs	Sobreira Formosa	-874063,86	4832874,27
184	N	3	M	CO	S	G	R	Sobreira Formosa	-874063,86	4832874,27
185	N	2	M	MD	N	C	Cs	Sobreira Formosa	-874063,86	4832874,27
186	N	3	M	MD	N	G	R	Conqueiros	-869775,95	4834113,02
187	N	1	M	CO	N	G	R/Cs	Conqueiros	-869775,95	4834113,02
188	N	8	M	MD	N	C	R/Cs	Conqueiros	-869775,95	4834113,02
189	N	7	M	MD	N	G	R/Cs	Conqueiros	-869775,95	4834113,02
190	N	4	F	CT	N	G	R	Pereiro	-873614,75	4831009,63
191	N	3	F	CT	N	G	R	Vale Ursa	-876533,78	4837824,98
192	N	7	F	CT	N	G	R	Vale Ursa	-876533,78	4837824,98
193	N	4	M	CT	N	G	R	Castanheira	-877084,92	4836627,13
194	N	8 m	F	CT	N	C	Cs	Figueira	-874279,15	4829976,67
195	N	3	M	CO	N	G	R	Figueira	-874279,15	4829976,67
196	N	2	M	CO	N	C	R/Cs	Esfrega/Póvoa	-871341,15	4843244,76
197	P	10	F	CT	N	G	R	Póvoa	-874607,47	4833787,97
198	N	2	F	CT	N	C	R	Póvoa	-874607,47	4833787,97
199	P	8	M	CT	S	Ca	R	Atalaias	-876839,98	4832093,45
200	N	3	M	CT	N	C	Cs	Atalaias	-876839,98	4832093,45
201	P	8	F	CT	S	C	R	Atalaias	-876839,98	4832093,45

202	P	2	M	CO	N	G	R	Atalaia	-876839,98	4832093,45
203	N	3	M	CT	N	G	R/Cs	Atalaia	-876839,98	4832093,45
204	N	3	M	CT	N	G	R/Cs	Atalaia	-876839,98	4832093,45
205	N	3	M	CT	N	G	R/Cs	Atalaia	-876839,98	4832093,45
206	N	9	M	CO	N	G	R	Pucariço	-875198,96	4831859,62
207	N	4	M	CT	N	G	R	Pucariço	-875198,96	4831859,62
208	N	2	F	CT	N	C	Cs	Estevês	-871720,61	4822904,92
209	N	5	F	CT	N	Ca	R	Estevês	-871720,61	4822904,92
210	N	10	F	MD	N	G	Cs	Estevês	-871720,61	4822904,92
211	N	2	F	MD	S	G	R	Estevês	-871720,61	4822904,92
212	N	1	M	CT	N	G	R	Estevês	-871720,61	4822904,92
213	N	4	F	CT	N	C	Cs	Estevês	-871720,61	4822904,92
214	N	10	M	CT	N	Ca	R	Estevês	-871720,61	4822904,92
215	P	5	M	MD	S	Ca	R	Estevês	-871720,61	4822904,92
216	N	7	F	MD	N	Ca	R	Peral	-868406,05	4821323,29
217	N	1	M	CT	N	Ca	R	Peral	-868406,05	4821323,29
218	P	4	M	CT	S	Ca	R	Peral	-868406,05	4821323,29
219	P	5	F	CT	N	Ca	R	Vale Mua	-867351,77	4822189,39
220	N	7	F	CT	N	C	R/Cs	Vale Mua	-867351,77	4822189,39
221	N	2	F	CO	N	Ca	R	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
222	N	4	M	CT	N	Ca	R	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
223	N	2	F	CT	S	Ca	R	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
224	N	2	M	CT	N	C	Cs	Vale Mua	-867351,77	4822189,39
225	N	5	M	MD	N	Ca	R	Peral	-868406,05	4821323,29
226	N	7	F	MD	N	Ca	R	Peral	-868406,05	4821323,29
227	N	5	M	MD	S	Ca	R	Peral	-868406,05	4821323,29
228	N	10	F	MD	N	Ca	R	Peral	-868406,05	4821323,29
229	N	4	M	CT	N	C	Cs	Peral	-868406,05	4821323,29
230	N	2	M	MD	N	Ca	R	Peral	-868406,05	4821323,29
231	P	6	F	CT	N	Ca	R	Padrão	-870327,79	4808297,37
232	N	2	M	CT	N	Ca	R	Padrão	-870327,79	4808297,37
233	P	8	M	CT	N	Ca	R	Padrão	-870327,79	4808297,37
234	P	3	F	CT	S	Ca	R	Padrão	-870327,79	4808297,37
235	N	1	F	CO	N	Ca	R	Padrão	-870327,79	4808297,37
236	N	8	M	MD	N	Ca	R	Padrão	-870327,79	4808297,37
237	N	4	M	MD	N	Ca	R	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
238	N	5	M	CO	S	Ca	R	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
239	N	2	F	CO	S	Ca	R	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
240	N	4	M	CT	N	Ca	R	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
241	N	8	F	CT	S	Ca	R	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
242	P	2	F	CT	S	Ca	R	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
243	N	1	M	CT	N	Ca	R	São Pedro	-873261,65	4813453,43

								Esteval		
244	N	2	M	CT	S	Ca	R	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
245	N	12	F	CT	N	C	Cs	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
246	N	3	F	CT	N	Ca	R	São Pedro Esteval	-873261,65	4813453,43
247	N	2	F	CT	N	Ca	R	Monte Fundeiro	-889620,28	4815111,67
248	N	3	M	MD	N	Ca	R	Monte Fundeiro	-889620,28	4815111,67
249	P	5	F	CT	N	Ca	R	Monte Fundeiro	-889620,28	4815111,67
250	P	3	F	CO	N	Ca	R	Monte fundeiro	-889620,28	4815111,67
251	N	1	F	MD	N	Ca	R	Monte Fundeiro	-889620,28	4815111,67
252	N	3	M	MD	N	Ca	R	Monte Fundeiro	-889620,28	4815111,67
253	N	1	F	CT	N	Ca	R	Monte Fundeiro	-889620,28	4815111,67
254	N	9 m	M	CT	N	C	Cs	Murteirinha	-872029,5	4819584,09
255	N	7	M	CT	N	C	Cs	Murteirinha	-872029,5	4819584,09
256	N	2	M	CT	N	Ca	R	Murteira	-878285,41	4819825,07
257	N	3	M	CT	N	Ca	R	Murteira	-878294,96	4819829,84
258	N	8	F	CT	N	Ca	R	Murteira	-878294,96	4819820,29
259	N	1	M	CT	N	Ca	R	Murteira	-878299,73	4819815,52
260	N	2	F	CT	N	Ca	R	Murteira	-878304,5	4819815,52
261	N	4	F	CT	N	Ca	R	Murteira	-878294,96	4819820,29
262	N	9	M	CT	S	Ca	R	Murteira	-878294,96	4819825,07
263	N	3	M	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
264	N	2	F	MD	N	E	E	Proença-a-Nova		
265	N	2	F	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
266	P	4	M	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
267	P	2	M	MD	N	E	E	Proença-a-Nova		
268	N	3	M	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
269	N	2	F	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
270	N	3	F	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
271	N	2	M	MD	N	E	E	Proença-a-Nova		
272	N	6	F	MD	N	E	E	Proença-a-Nova		
273	N	2	M	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
274	N	4	M	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
275	N	2	M	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
276	N	5	M	MD	N	E	E	Proença-a-Nova		
277	N	3	F	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
278	N	4	F	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
279	N	2	M	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		
280	N	2	M	MD	N	E	E	Proença-a-Nova		
281	N	6	F	MD	N	E	E	Proença-a-Nova		
282	N	5	F	CT	N	E	E	Proença-a-Nova		

Legenda: N^o - número do animal; RI – resultados; m- meses; CT – curto; MD – médio; M – macho; F – fêmea; CO – comprido; C- companhia; Ca – caça; G – guarda; E – errante; R – rua; Cs – casa;